

Université de Montréal

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARN_m DE L'INTERLEUKINE-17
DANS LES LAVAGES BRONCHO-ALVÉOLAIRES DES CHEVAUX
ATTEINTS DU SOUFFLE

Par

MARIE DEBRUE

Département des sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vu de l'obtention du grade
Maître ès science (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

Mars, 2004

©Marie Debrue, 2004



SF

607

U54

2004

V. 014

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARN_m DE L'INTERLEUKINE-17
DANS LES LAVAGES BRONCHO-ALVÉOLAIRES DES CHEVAUX
ATTEINTS DU SOUFFLE

Présenté par

MARIE DEBRUE

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

André Bisailon, président-rapporteur

Jean-Pierre Lavoie, directeur de recherche

Daniel Jean, membre du jury

Résumé en Français

Le souffle chez le cheval est caractérisé par une hyperréactivité bronchique, une obstruction respiratoire réversible et une neutrophilie pulmonaire. Les chevaux atteints du souffle expriment, de façon prédominante, des cytokines ayant un profil de type Th2. Cependant, il est difficile d'expliquer comment les lymphocytes CD4⁺ sécrétant des cytokines de type Th2 induisent la neutrophilie pulmonaire dans le souffle. L'IL-17, cytokine récemment décrite, est produite par les lymphocytes T CD4⁺ et promeut, indirectement, la maturation, le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ARNm de l'IL-17 est surexprimé dans les cellules du lavage bronchoalvéolaire (LBA) des chevaux atteints du souffle en comparaison avec les chevaux contrôles.

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié quatre chevaux contrôles et quatre chevaux atteints du souffle après trois mois de pâturage (rémission clinique) et après 35 jours d'exposition continue à du foin. Le LBA et les mécaniques respiratoires ont été réalisés lors de ces deux périodes. L'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été étudiée via des PCR en temps réel (Lightcycler®). Le gène domestique utilisé était le CD3zeta afin de corriger les variations du pourcentage de lymphocytes T présents dans les LBA.

Aucune différence significative ($p < 0,05$) dans le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes lorsque les chevaux étaient au pâturage. A l'inverse, après 35 jours d'exposition au foin, les chevaux atteints du souffle présentaient une augmentation significative ($p < 0,05$) du niveau d'expression de l'IL-17 en comparaison avec le groupe de chevaux contrôles.

Ces résultats préliminaires nous laissent à penser que l'IL-17 intervient dans la pathogenèse du souffle.

Mots clés: souffle, chevaux, IL-17, cytokine, neutrophilie pulmonaire.

Résumé en Français

Le souffle chez le cheval est caractérisé par une hyperréactivité bronchique, une obstruction respiratoire réversible et une neutrophilie pulmonaire. Les chevaux atteints du souffle expriment, de façon prédominante, des cytokines ayant un profil de type Th2. Cependant, il est difficile d'expliquer comment les lymphocytes CD4+ sécrétant des cytokines de type Th2 induisent la neutrophilie pulmonaire dans le souffle. L'IL-17, cytokine récemment décrite, est produite par les lymphocytes T CD4+ et promeut, indirectement, la maturation, le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ARNm de l'IL-17 est surexprimée dans les cellules du lavage bronchoalvéolaire (LBA) des chevaux atteints du souffle en comparaison avec les chevaux contrôles.

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié 4 chevaux contrôles et 4 chevaux atteints du souffle après 3 mois de pâturage (rémission clinique) et après 35 jours d'exposition continue à du foin. LBA et mécaniques respiratoires ont été réalisées lors de ces deux périodes. L'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été étudiée via des PCR en temps réel (Lightcycler®). Le gène domestique utilisé était le CD3zeta afin de corriger les variations du pourcentage de lymphocytes T présents dans les LBA.

Aucune différence significative ($p < 0,05$) dans le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes lorsque les chevaux étaient au pâturage. A l'inverse, après 35 jours d'exposition au foin, les chevaux atteints du souffle présentaient une augmentation significative ($p < 0,05$) du niveau d'expression de l'IL-17 en comparaison avec le groupe de chevaux contrôles.

Ces résultats préliminaires nous laissent à penser que l'IL-17 intervient dans la pathogenèse du souffle.

Mots clés: souffle, chevaux, IL-17, cytokine, neutrophilie pulmonaire.

English summary

Heaves in horses is characterized by airway hyperresponsiveness, reversible airway obstruction and airway neutrophilia. Affected horses express a predominant Th2-type cytokine response. However, little is known concerning the possible contribution of Th2-type cytokine to the pulmonary neutrophilia. IL-17 is a recently described cytokine produced by activated T-cells that indirectly promote the maturation, chemotaxis and activation of neutrophils. We therefore hypothesized that IL-17 mRNA expression would be increased in BAL cells of horses with heaves compared to controls.

To test that hypothesis, we studied control horses (n=4) and heaves affected horses (n=4) after 3 months of pasture (clinical remission) and after 35 days of continuous natural hay inhalation challenge. BAL and respiratory mechanics were performed at both time periods. The mRNA expression of IL-17 was studied using real-time PCR (Lightcycler®). CD3zeta was used as housekeeping gene to correct for the variation of T-cell numbers in BALs.

There was no significant difference ($p < 0.05$) in IL-17 mRNA expression between groups of horses when in pasture. However, there was a significant difference in IL-17 mRNA expression between groups with hay exposure.

These preliminary results suggest that IL-17 may contribute in the pathogenesis of horses with heaves following chronic antigen challenge.

Key words: heaves, horses, IL-17, pulmonary neutrophilia, cytokine.

Table des matières

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	III
ENGLISH SUMMARY	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II : RECENSION DE LA LITTÉRATURE	3
I LE SOUFFLE	3
1 <i>Syndrôme clinique</i>	3
2 <i>Nomenclature</i>	4
3 <i>Étiologie</i>	5
A Éléments supportant l'hypothèse de l'allergie	5
B Cytokines de type Th2.....	6
C Autres éléments impliqués dans l'étiologie	7
4 <i>Pathogenèse</i>	8
A Le bronchospasme.....	8
B Le mucus	9
C Inflammation	10
• Mastocytes:	10
• Lymphocytes:.....	11
• Macrophages:	12
• Neutrophiles	13
D Remodelage tissulaire	17
5 <i>Évaluation de la fonction respiratoire et de la neutrophilie pulmonaire</i>	18
A Mécanique respiratoire.....	19
B Gaz sanguins	21
C Distribution de la ventilation.....	21

D Lavage broncho-alvéolaire et endoscopie	22
II L'INTERLEUKINE-17	23
1 <i>IL-17 ou IL-17A</i>	23
A Généralités	23
B Importance au niveau pulmonaire	24
2 <i>IL-17B</i>	26
3 <i>IL-17C</i>	27
4 <i>IL-17F</i>	27
5 <i>IL-25 ou IL-17E</i>	28
6 <i>Récepteurs</i>	29
A Le récepteur de l'IL-17 (IL-17R)	29
B IL-17RB ou IL17RH1	29
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE	30
I CHEVAUX	30
II ÉVALUATION DE LA FONCTION PULMONAIRE	31
1 <i>Mécanique respiratoire</i>	31
2 <i>Lavage broncho-alvéolaire (LBA)</i>	32
III RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS	33
IV DESIGN DE L'ÉTUDE	34
V ANALYSES STATISTIQUES	34
VI EXTRACTION DE L'ARNM ET SYNTHÈSE DE L'ADNC	34
1 <i>Extraction</i>	34
2 <i>Synthèse de l'ADNc (RT)</i>	35
VII QUANTIFICATION RELATIVE DE L'ADNC	35
CHAPITRE IV : ARTICLE.....	41
CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS.....	64
I RÔLES POTENTIELS DE L'IL-17 DANS LA PATHOGENÈSE DU SOUFFLE.	64
II AUGMENTATION DU POURCENTAGE DE NEUTROPHILE CHEZ LES CHEVAUX CONTRÔLES APRÈS STIMULATION	66
III PERSPECTIVES.....	68
CHAPITRE VI : CONCLUSION.....	69
CHAPITRE VII : BIBLIOGRAPHIE	70

Liste des tableaux

Tableau I	Descriptifs des chevaux (sexe, âge, race, poids, groupe).....	30
Tableau II	Amorces spécifiques pour IL-17 et CD3zeta.....	36
Tableau III	Mélange utilisé pour un échantillon lors d'une PCR en temps réel.....	37
Tableau IV	Programme lightcyler, phase 1 : Dénaturation.....	38
Tableau V	Programme lightcyler, phase 2 : Amplification	38
Tableau VI	Programme lightcyler, phase 3 : Courbe de température.....	39
Tableau VII	Programme lightcyler, phase 4 : Refroidissement	39

Liste des abréviations

Ach	Acétylcholine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
eNANC	Excitateur Nonadrénergique-Noncholinergique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
E _L	Élastance Pulmonaire
ELA	Élastase
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor Facteur de Croissance Hématopoïétique G-CSF
GCP	Granulocyte Chemotactic Protein Protéine Chimiotactique pour les Granulocytes
GM-CSF	Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor Facteur de Croissance Hématopoïétique GM-CSF
GRO	Growth Related Gene Gène relatif à la croissance
15-HETE	Acide 15-Hydroxyeicosatétraénoïque 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule Molécule d'Adhésion Intercellulaire
iNANC	Inhibiteur NonAdrénérgique-NonCholinergique Unadrenergic-Uncholinergic Inhibitor
INF	Interphéron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LPAR	Lavage Pulmonaire à l'Azote au cours de Respirations répétitives

MCP	Monocyte Chemoattractant Protein Protéine Chimioattractive pour les Monocytes
MHC	Major Histocompatibility Complex Complexe Majeur d'Histocompatibilité
MIP	Macrophage Inflammatory Protein Protéine Inflammatoire des Macrophages
MPO	Myéloperoxydase
NF- κ B	Facteur Nucléaire- κ B
NK	Natural Killer Tueuse Naturelle
PG	Prostaglandine
PAF	Platelet Activator Factor Facteur d'Activation Plaquettaire
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique
PCR	Polymerase Chain Reaction Amplification en chaîne par polymérase
Δ Ppl	Variation maximale de la pression intrapleurale
RAO	Reccurent Airways Obstruction Obstruction Récurrente des Voies Respiratoires
RT	Reverse Transcriptase Transcriptase Inverse
R _L	Résistance Pulmonaire
TGF	Transforming Growth Factor Facteur de Croissance Transformant
Th	T-helper T-auxilliaire
TNF	Tumor Necrosis Factors Facteur Onconécrosant
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule Molécule d'adhésion des Cellules Vasculaires

V_T

Tidal Volume

Volume Courant

Chapitre I : Introduction

Le souffle est une pathologie respiratoire équine présentant de nombreuses similitudes avec l'asthme chez l'homme comme l'inflammation des voies respiratoires profondes, un bronchospasme, une hyperréactivité bronchique, ainsi qu'une surproduction de mucus menant à une obstruction respiratoire habituellement réversible^{1,2}. En dépit de l'importance de la maladie, l'étiologie demeure obscure, bien qu'il soit généralement considéré qu'une hypersensibilité à des moisissures présentes dans le foin en soit responsable, la symptomatologie du souffle pouvant être induite chez les chevaux susceptibles par l'inhalation de poussières provenant de foin de pauvre qualité. De plus, cette maladie est habituellement réversible lorsque les chevaux sont soustraits de cette stimulation, notamment en les mettant en prairie^{3,4}.

Dans le souffle, comme dans l'asthme, les lymphocytes CD4+, présents en grand nombre dans la paroi des voies respiratoires, semblent orchestrer la réaction inflammatoire^{1,5,6}. Dans l'asthme, les CD4+ agissent sur les autres populations cellulaires en sécrétant des cytokines ayant un profil de type Th2. La sécrétion de ces cytokines aboutit notamment à une infiltration d'éosinophilie dans les voies respiratoires profondes¹. Dans le souffle, alors qu'un profil de cytokines de type Th2 prédomine, une neutrophilie, et non une éosinophilie, s'installe⁷⁻¹¹. Les neutrophiles activés, présents dans les voies respiratoires, libèrent alors de nombreux médiateurs capables d'exacerber la réaction inflammatoire et d'altérer le tissu pulmonaire¹²⁻¹⁴. Si l'infiltration d'éosinophile dans l'asthme est médiée par l'action d'IL-5, aucun mécanisme immunitaire connu n'explique comment les lymphocytes CD4+ sécrétant des cytokines de type Th2 induisent la neutrophilie pulmonaire dans le souffle.

Récemment, l'IL-17, cytokine pro-inflammatoire produite par les CD4+, a été découverte¹⁵⁻¹⁷. Cette cytokine pourrait être le lien recherché entre les lymphocytes de type Th2 et la neutrophilie pulmonaire^{14,18}. En effet, lorsque l'IL-17 est utilisée pour stimuler des cultures cellulaires (entre autres de fibroblastes bronchiques ou de cellules épithéliales bronchiques), celles-ci surexpriment et produisent des cytokines ayant un

puissant pouvoir attractif pour les neutrophiles (IL-8, MIP-2, IL-6, GRO- α , GCP-2)^{19,20}. Les expériences réalisées *in vivo* semblent confirmer le potentiel chimiotactique de l'IL-17. Ainsi, l'instillation intratrachéale d'IL-17 chez des rats est suivie d'une neutrophilie pulmonaire et ce, de façon dose dépendante²¹. De plus, lorsqu'on mesure le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 chez des souris servant de modèle pour l'asthme chez l'homme, (préalablement sensibilisées à l'ovalbumine puis soumises à l'inhalation d'ovalbumine) une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-17 est concomitante avec un afflux de neutrophiles dans les voies respiratoires après exposition à l'allergène; un prétraitement avec des anticorps monoclonaux Anti-IL-17 diminue cette neutrophilie de la même manière qu'un traitement stéroïdien (dexaméthazone)²². En plus d'être potentiellement chimiotactique pour les neutrophiles, l'IL-17 est capable d'induire leur activation²³. *In vitro*, l'IL-17 induit notamment la sécrétion d'IL-8, cytokine ayant un puissant pouvoir chimiotactique et surexprimée chez les chevaux atteints du souffle^{10,19,24,25}. D'autre part, l'IL-17 est significativement augmentée chez les patients souffrant d'asthme^{20,26,27}. Il semble évident que l'IL-17 joue un rôle clé dans la pathogenèse de l'asthme en induisant la sécrétion de cytokines proinflammatoires, chimiotactiques et profibrotiques et en stimulant l'expression de gènes responsables de la production des glycoprotéines constituant le mucus^{20,26-28}.

Ce projet tente donc de déterminer que l'expression de l'ARNm de l'IL-17 par les cellules du LBA augmente chez les chevaux atteints du souffle après une exposition prolongée aux allergènes comparativement aux chevaux contrôles.

Chapitre II : Recension de la littérature

I LE SOUFFLE

1 SYNDROME CLINIQUE

Le souffle est une pathologie respiratoire couramment décrite chez le cheval adulte soumis à un challenge environnemental comme l'exposition aux allergènes présents dans le foin. Poser un diagnostic de souffle requiert deux conditions. Premièrement, lorsque le cheval est exposé au foin, des évidences d'obstruction respiratoire chronique doivent être présentes. Cette obstruction respiratoire est généralement réversible en modifiant l'environnement ou par administration de bronchodilatateur ou de corticostéroïdes. Ensuite, le pourcentage de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) doit augmenter ².

Le souffle présente un tableau clinique très variable en fonction de la sévérité de l'atteinte et du degré d'exposition aux allergènes. Asymptomatiques au pré, les chevaux peuvent devenir fortement symptomatiques rapidement après les avoir mis en box et nourris avec du foin ²⁹. Les chevaux en rémission sont susceptibles de ne présenter que des modifications mineures à l'auscultation et à l'endoscopie des voies respiratoires voire aucune anomalie. Lors d'exacerbation clinique, des bruits respiratoires anormaux sont présent ainsi que des sécrétions bronchiques ³. Les symptômes cliniques peuvent varier de la toux chronique sèche à de l'insuffisance respiratoire visible au repos, de l'intolérance à l'effort, une toux productive, un jetage purulent intermittent. L'insuffisance respiratoire se traduit par une expiration typiquement abdominale pouvant s'accompagner d'une hypertrophie des muscles abdominaux, une dilatation des naseaux lors de l'inspiration et un pompage anal ^{29,30}. Très rarement observée chez les jeunes chevaux, l'incidence de la maladie augmente avec l'âge. La race et le sexe ne sont pas des facteurs prédisposant ^{3,30}.

La prévalence de la maladie est nettement supérieure dans l'hémisphère nord où les chevaux sont en box sur paille et nourris avec du foin durant l'hiver. De plus, dans ces régions, le foin est souvent de pauvre qualité au vu des étés humides. La maladie est plus rare sous des climats chauds et secs comme en Australie ou en Californie ³. Cependant, dans ces régions, un syndrome d'obstruction respiratoire associé au pâturage existe. Les chevaux atteints présentent sensiblement les mêmes symptômes mais les crises se développent alors qu'ils sont en prairie ³¹.

2 NOMENCLATURE

Ces dernières années, un débat quant au nom à attribuer à cette pathologie a lieu dans la communauté scientifique. Connue auparavant sous de nombreux noms tels que souffle, pousse, emphysème et bronchite chronique, l'appellation COPD (chronique obstructive pulmonary disease) a été introduite en 1971. Choisi en raison de son caractère descriptif quant à la pathologie (maladie chronique dans laquelle une obstruction respiratoire se développe), ce terme souligne également certaines similitudes avec la pathologie humaine portant le même nom (neutrophilie pulmonaire et accumulation de mucus dans les voies respiratoires). Cependant, depuis l'introduction de ce nom, les connaissances acquises à propos de ces pathologies humaine et équine se sont fortement développées. On sait notamment que, chez le cheval, cette maladie est caractérisée par une obstruction des voies respiratoires généralement réversible principalement due à un bronchospasme. Alors que chez l'homme, la réversibilité est le fait de l'asthme plutôt que COPD, laquelle est une maladie progressive peu réversible et en relation avec le tabagisme. Utiliser l'appellation COPD crée une confusion puisque cela suggère que les symptômes présentés par un cheval atteint sont irréversibles. De plus, le terme COPD employé en médecine vétérinaire équine est souvent utilisé et ce de manière abusive pour décrire l'état d'un cheval souffrant d'une inflammation des voies respiratoires quels que soient son âge et les raisons de cette inflammation. Lors d'un atelier tenu en 2000 portant sur ce sujet, il a été proposé que le terme souffle ou pousse soit utilisé en français et "heaves" ou RAO (recurrent airway obstruction) en anglais ^{2,32,33}.

3 ÉTIOLOGIE

En dépit de l'importance de la maladie, l'étiologie en demeure obscure, bien qu'il soit généralement considéré qu'une réaction allergique aux moisissures présentes dans le foin en soit responsable. Les écuries sont un environnement particulièrement riche en poussières contenant plus de 50 types de spores, de nombreux acariens, endotoxines et composés inorganiques ³⁴. Ces particules proviennent du foin, de la paille et des acariens qui, en ingérant les spores présentent les antigènes dans leurs fèces ³. Le foin est souvent placé en hauteur ce qui conduit à une dispersion importante de la poussière au niveau du nez des chevaux lorsqu'ils le mangent. L'importance relative de chacun de ces agents est inconnue. En effet, il a été montré que les chevaux atteints du souffle présentent une inflammation pulmonaire et des dysfonctionnements respiratoires en réponse à l'inhalation d'extraits d'*Aspergillus fumigatus* ou de *Faenis rectivirgula*, mais ce de façon moins importante que lors d'exposition au foin et à la paille. Il est donc probable qu'il s'agisse d'une affection multifactorielle, la pathogénicité de certains facteurs (par exemple des spores) étant potentialisée par d'autres (par exemple les endotoxines) ^{34,35}.

A ÉLÉMENTS SUPPORTANT L'HYPOTHÈSE DE L'ALLERGIE

Contrairement aux chevaux sains, chez les chevaux atteints du souffle, il est possible d'induire de façon répétitive l'obstruction des voies respiratoires et l'inflammation pulmonaire en les exposant au foin moisi et poussiéreux. Faire inhaler des extraits de spores et d'actinomycètes tels que *Aspergillus fumigatus*, *Faenis rectivirgula*, *Microspolispora faeni* et *Thermoactinomyces vulgaris* provoque également l'apparition d'un syndrome clinique de moindre envergure que lors d'un challenge naturel au foin ^{30,36}. Ces spores, dont le diamètre est de 0,5 - 3,0 µm, sont suffisamment petites pour atteindre le système respiratoire profond ³. Pour soutenir la théorie de l'allergie, la pathologie est réversible lorsqu'on cesse l'exposition des animaux aux allergènes en les laissant à l'extérieur, sans foin ni paille ⁴. De plus, chez les chevaux atteints, on observe de plus hauts titres d'anticorps sériques et dans les LBA (IgE) dirigés contre *Aspergillus fumigatus* et *Microspolispora faeni* ^{37,38}. Par ailleurs, la majorité des chevaux atteints du souffle sont positifs aux tests intradermiques utilisant ces mêmes antigènes. Cependant,

de nombreux chevaux sains montrent également des titres d'anticorps sériques et des tests intradermiques positifs contre ces mêmes antigènes. Ainsi, à l'inverse, certains chevaux atteints du souffle sont négatifs pour ces deux tests, ce qui rend ces épreuves inutilisables comme moyens diagnostiques ³⁰.

B CYTOKINES DE TYPE TH2

Les lymphocytes CD4⁺ sont de deux types principaux en fonction du profil de cytokines sécrétées. Les cytokines produites par les lymphocytes CD4⁺ de type Th1 (IL-2 et INF- γ) promeuvent, entre autre, l'immunité cellulaire en stimulant l'activation des macrophages et la production d'IgG, favorisant une réaction d'hypersensibilité retardée alors que celles sécrétées par les lymphocytes de type Th2 (par exemple : IL-4, IL-5 et IL-13) stimulent les lymphocytes B et la production d'IgE, initiant une réaction d'hypersensibilité immédiate ^{39,40}.

Le souffle et l'asthme chez l'humain présentent de nombreuses similitudes, notamment l'inflammation des voies respiratoires profondes, l'obstruction réversible des voies respiratoires et l'hypersensibilité bronchique. L'asthme chez l'humain peut être une affection allergique, en réponse à la présence d'allergènes dans l'air, ou non-allergique bien que de plus en plus d'évidences suggèrent que la physiopathologie (Th2) est la même dans les 2 groupes ¹. Ainsi, tout comme dans le mécanisme immunitaire de l'asthme chez l'homme, on observe que les cellules pulmonaires des chevaux atteints du souffle expriment un profil de cytokine de type Th2, avec une augmentation de l'expression de l'IL-4 et IL-5 ainsi qu'une diminution de l'expression de INF- γ par les cellules présentes dans le LBA des chevaux atteints du souffle ⁸⁻¹⁰. Dans l'asthme les lymphocytes Th2, présents en grand nombre dans la paroi des voies respiratoires, sont considérés comme les cellules orchestrant la réaction inflammatoire ^{1,41}. Cependant, alors qu'une éosinophilie pulmonaire est présente chez l'humain asthmatique et chez les animaux rendus allergiques expérimentalement, une neutrophilie pulmonaire, mal expliquée par l'action des cytokines de type Th2, se développe chez les chevaux atteints du souffle ^{1,11}. De même, en utilisant un modèle d'allergie pulmonaire où des chevaux sont sensibilisés à l'ovalbumine puis soumis à l'inhalation d'ovalbumine, une surexpression d'ARNm de cytokine de type Th2 associée à une augmentation du

pourcentage de neutrophiles dans le LBA est également observée ⁴². Aucun mécanisme immunitaire connu ne relie cependant ce type de cytokine et la neutrophilie.

C AUTRES ÉLÉMENTS IMPLIQUÉS DANS L'ÉTIOLOGIE

Le souffle semble avoir une composante génétique. En effet, un cheval a 3,2 fois plus de chance de développer la pathologie ($p < 0,05$) si l'un de ses deux parents est atteint et 4,6 fois plus de chance ($p < 0,05$) si les deux sont atteints par rapport à un cheval dont les deux parents sont sains ⁴³. Une exposition chronique aux allergènes provoque une augmentation de la prévalence de la maladie. On observe d'ailleurs qu'il est extrêmement rare pour un cheval de moins de 5 ans d'être atteint du souffle. Un environnement de pauvre qualité est donc probablement moins bien toléré par les chevaux génétiquement prédisposés. Ces observations sont similaires chez l'homme souffrant d'asthme ⁴⁴.

Les infections virales pulmonaires ont été suggérées comme cause prédisposant au développement du souffle chez le cheval. En effet, il a été rapporté que les chevaux atteints du souffle ont de plus hauts niveaux d'inhibition d'activité de l'hémagglutination dus à l'influenza A que les chevaux sains ³. Les infections virales prédisposeraient les voies respiratoires à devenir hyperéactives et enflammées. En effet, en lésant l'épithélium respiratoire et en exposant les récepteurs sous-jacents aux agents irritants, ainsi qu'en provoquant un dysfonctionnement de l'appareil muco-ciliaire, cela aboutit à une diminution de la clairance des voies respiratoires et à la pénétration d'allergènes ou d'agents irritants en profondeur ^{29,30}. Cependant aucune évidence d'une implication virale dans l'étiologie du souffle chez le cheval n'a pu être clairement démontrée.

Les agents pneumotoxiques pourraient également être impliqués dans l'étiologie du souffle. Il a été démontré que le 3-méthylindole, responsable de la "fièvre des brouillards" chez le bovin, ingéré par un cheval, provoque un syndrome sensiblement semblable à ceux observés lors d'une crise de souffle. Cependant, contrairement aux bovins, chez les chevaux, le 3-méthylindole n'est pas un produit naturel du métabolisme gastro-intestinal du tryptophane. Il n'est cependant pas exclu, bien que peu probable, que l'ingestion d'un autre agent pneumotoxique, semblable au 3-méthylindole et présent

dans le foin, soit responsable d'une pathologie pulmonaire caractérisée par de la bronchiolite et les signes cliniques du souffle ^{3,30,45}.

Les endotoxines présentes dans le foin pourraient contribuer à l'exacerbation de l'inflammation et de l'obstruction respiratoire. Des expériences montrent que les endotoxines potentialisent l'effet des composés organiques du foin ³⁵.

Le souffle semble donc être une pathologie multifactorielle ayant une base génétique. Une faible qualité de l'environnement est probablement moins bien tolérée, au niveau pulmonaire, par les chevaux génétiquement prédisposés au souffle ⁴³.

4 PATHOGENÈSE

Le souffle est caractérisé par plusieurs événements physiopathologiques majeurs : un bronchospasme, une inflammation, une hypersécrétion de mucus et un remodelage tissulaire au niveau pulmonaire. Malgré de nombreuses études, les relations entre l'étiologie, les changements structurels, l'hyperréactivité des voies respiratoires et leur inflammation ne sont pas entièrement comprises ⁴⁶.

A LE BRONCHOSPASME

Le principal rôle du muscle lisse des voies respiratoires est de contrôler le diamètre de celles-ci, afin d'optimiser l'équilibre entre la résistance au débit d'air et l'espace mort physiologique. La contraction des muscles lisses des petites voies respiratoires est une cause majeure de l'obstruction des voies respiratoires chez les chevaux cliniquement atteints du souffle. La contraction, comme la relaxation du muscle lisse est régulée par des mécanismes homéostatiques ainsi que par des médiateurs humoraux et neuronaux ⁴⁷.

Il est probable que différents médiateurs tels l'acétylcholine (Ach), l'histamine, le tromboxane, les prostaglandines (PG)E₂, interagissent sur les muscles lisses, les nerfs moteurs et sensitifs des voies respiratoires. Chez les chevaux atteints du souffle, une diminution du système inhibiteur non adrénérgique non cholinergique (iNANC) accompagnée d'une diminution de la production de PGE₂, une augmentation d'excrétion d'Ach ainsi qu'une augmentation de la production de médiateurs stimulateurs tels que

l'histamine et le 15-HETE expliquent, en partie, l'apparition d'un bronchospasme chez les chevaux souffrant d'une crise de souffle^{3,30,48-51}.

L'hypersensibilité des voies respiratoires contribue à expliquer le caractère spectaculaire que peut prendre le bronchospasme chez les chevaux atteints du souffle. L'hypersensibilité est une réponse exagérée des voies respiratoires aux médiateurs de l'inflammation, aux neurotransmetteurs bronchospastiques et aux agents non spécifiques, comme la poussière. Des études morphométriques indiquent que, chez les chevaux atteints du souffle, l'épaisseur de la muqueuse et de la sous-muqueuse des voies respiratoires est augmentées³. L'augmentation de l'épaisseur de la paroi des voies respiratoires contribue probablement à l'exacerbation de l'obstruction. Quand le muscle lisse se contracte autour d'une muqueuse épaissie, le rétrécissement résultant est exagéré. Un faible degré de contraction des muscles peut dès lors aboutir à une diminution dramatique de la lumière des voies respiratoires. Un faible niveau d'allergènes ou de médiateurs de l'inflammation, sans impact sur les chevaux contrôles, est donc capable de provoquer une diminution importante de la lumière des voies respiratoires lors d'une crise aiguë de souffle^{3,30}.

B LE MUCUS

La présence d'une grande quantité de mucus dans les voies respiratoires est une observation caractéristique, lors de bronchoscopie et de nécropsie, des chevaux atteints du souffle⁵². La quantité de mucus présente dans la lumière des voies respiratoires résulte d'un équilibre dynamique entre la production (comprenant l'expression des gènes, le stockage et l'excrétion de la mucine) et la clairance, dépendant du tapis mucociliaire et des caractéristiques viscoélastiques du mucus⁵². L'hypersécrétion de mucus augmente la morbidité et la mortalité de la pathologie en aggravant l'obstruction des voies respiratoires et la diminution des échanges gazeux²⁸.

La métaplasie, l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules à gobelet chez les chevaux atteints du souffle ont été rapportées⁵³. Certains médiateurs peuvent, d'autre part, augmenter la production de mucus. Le 15-HETE, par exemple, tout comme les tachykinines, ont ce potentiel^{47,51}. De plus, chez les chevaux atteints du souffle, le 15-HETE est retrouvé en plus grande quantité au niveau pulmonaire que chez les chevaux

contrôles ⁵¹. Cette augmentation de production peut être, par ailleurs, aggravée par la diminution de la clearance. Une perte focale des cellules ciliées, remplacées par des cellules indifférenciées, et une malformation ciliaire ont été observées au niveau des bronches des chevaux atteints du souffle ⁵³. Cependant, certaines études rapportent qu'il n'y a pas de différence entre l'efficacité de la clearance muco-ciliaire des chevaux atteints du souffle et celle des chevaux normaux. D'autre part, une modification des propriétés viscoélastiques du mucus est un facteur majeur pouvant altérer l'efficacité de la clearance muco-ciliaire et le mécanisme de la toux ⁵². Une augmentation significative de la viscoélasticité du mucus trachéal est observée chez les chevaux cliniquement atteints du souffle en comparaison avec la viscoélasticité du mucus des chevaux sains ou en rémission ⁵⁴. Le pourcentage d'eau contenue dans le mucus influence fortement ses propriétés rhéologiques. Chez les chevaux, le degré d'hydratation du mucus ne semble pas responsable de l'augmentation de la viscoélasticité. La présence de cellules inflammatoires, comme les neutrophiles ont également un rôle important. En effet, chez l'homme, il est prouvé que les neutrophiles nécrotiques libèrent de l'ADN de haut poids moléculaire ainsi que des filaments d'actine augmentant la viscoélasticité du mucus ⁵².

C INFLAMMATION

- **Mastocytes:**

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires dont le cytoplasme contient de nombreux granules riches en histamines, médiateurs chimiotactiques, protéases, prostaglandines D2, leukotriènes (C4 et D4), facteurs activateurs plaquettaires (PFA), radicaux libres et cytokines (TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, chimiokines) ³⁹. Ces cellules expriment, en surface, des récepteurs se liant à la partie constante (Fc) des IgE et jouent un rôle clé dans le développement de la réaction d'hypersensibilité de type I. La réaction d'hypersensibilité de type I requiert donc la production d'IgE spécifiques aux allergènes rencontrés. Lorsque deux IgE sont liés aux récepteurs exprimés par les mastocytes et entrent en contact avec l'allergène qui leur est spécifique, le mastocyte se dégranule et libère les médiateurs dans le milieu extérieur, ce qui correspond à la phase initiale de la réaction d'hypersensibilité de type I qui débute

entre 5 et 30 minutes suivant l'exposition à l'allergène et se poursuit une heure environ³⁹. Les médiateurs libérés provoquent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses, une augmentation des sécrétions glandulaires et créent un chimiotactisme favorisant l'infiltration leucocytaire^{24,39}. Cette phase initiale est suivie d'une phase semi-retardée 2 à 8 heures après exposition et qui peut se poursuivre plusieurs jours. Cette phase semi-retardée est caractérisée par une infiltration leucocytaire habituellement imputée à la libération des médiateurs lors de la phase initiale³⁹.

L'augmentation des taux sérique et pulmonaire d'IgE et les tests intradermiques positifs chez les chevaux atteints du souffle soutiennent l'hypothèse d'une réaction d'hypersensibilité de type I des voies respiratoires en réponse à l'exposition au foin moisie⁸. Étonnamment, chez les chevaux atteints du souffle, la phase initiale de la réaction d'hypersensibilité de type I est absente. Seule la phase semi-retardée de la réaction est observée¹¹. En s'appuyant sur les pauvres résultats obtenus suite à l'administration d'antihistaminiques aux chevaux atteints du souffle, il semblerait que l'histamine ne joue pas un rôle important dans le développement du bronchospasme chez ces chevaux. Et ce malgré l'augmentation de la quantité d'histamine observée dans le LBA des chevaux atteints du souffle comparativement aux chevaux contrôles⁴⁸.

- **Lymphocytes:**

Il existe trois catégories principales de lymphocytes, d'une part, les cellules "natural killer" (NK) ou grands lymphocytes granulaires faisant partie de l'immunité murie et non spécifique, d'autre part les lymphocytes B responsables de l'immunité humorale, et enfin, les lymphocytes T qui médient l'immunité cellulaire. En fonction du type de récepteurs exprimés, les lymphocytes T se divisent, principalement, en lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et en lymphocytes T helper CD4+. Les CD8+ se lient au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) I, ce qui active les lymphocytes T cytotoxiques qui détruisent alors les cellules infectées par un virus. L'activation des lymphocytes T helper par la liaison de ces récepteurs CD4+ aux MHC II aboutit à l'activation des macrophages et des lymphocytes B. Les lymphocytes CD4+ sont de plusieurs types en fonction du profil de cytokines sécrétées. Les cytokines produites par les lymphocytes

CD4⁺ de type Th1 (IL-2 et INF- γ) promeuvent l'immunité cellulaire en stimulant l'activation des macrophages et la production d'IgG, favorisant une réaction d'hypersensibilité retardée alors que celles sécrétées par les lymphocytes de type Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) stimulent les lymphocytes B et la production d'IgE, initiant une réaction d'hypersensibilité immédiate. Enfin, les lymphocytes de type Th3 sont des cellules dites régulatrices et sécrètent notamment le TGF- β ^{39,40}.

En médecine humaine, de nombreuses études sur l'asthme montrent que les lymphocytes T activés, présents en grand nombre dans la paroi des voies respiratoires, orchestrent la réaction inflammatoire^{1,94}. Les cellules T, principalement des CD4⁺, agissent sur les autres cellules par le biais de médiateurs solubles, les cytokines. Le profil des cytokines produites par ces lymphocytes T est un profil de type Th2, avec sécrétion, entre autre, d'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13, caractéristique d'une inflammation d'origine allergique. L'IL-4 et l'IL-13, stimulent la production d'IgE par les lymphocytes B. Elles agissent aussi sur les molécules d'adhésion à l'endothélium vasculaire et sur le muscle lisse. L'IL-5 est chimiotactique pour les éosinophiles¹.

Certaines études montrent une augmentation de la proportion des CD4⁺ dans le LBA des chevaux atteints du souffle après exposition au foin comme c'est le cas chez les patients souffrant d'asthme soumis à un contact allergénique^{5,6}. A l'inverse, si l'étude de Watson en 1997⁵⁵ met en évidence une augmentation significative des CD4⁺ sanguins chez les chevaux atteints du souffle après stimulation en comparaison avec les chevaux contrôles, dans le LBA, une augmentation des lymphocytes B et non des CD4⁺ est observée. De plus, dans les LBA, un profil de cytokine de type Th2 a été mis en évidence, tout comme chez l'homme. Chez les chevaux atteints du souffle, comparativement aux chevaux contrôles, une augmentation de l'expression de l'IL-4, l'IL-5 et une diminution de l'expression de INF- γ sont présentes dans les LBA⁸⁻¹⁰. Cependant, alors que chez l'humain asthmatique on observe une éosinophilie pulmonaire, chez les chevaux atteints du souffle, une neutrophilie pulmonaire est présente^{1,11}.

- **Macrophages:**

Chez les animaux sains et chez les chevaux atteints du souffle en rémission, la population cellulaire présente au niveau des alvéoles est constituée de macrophages (40-60%) et de lymphocytes (30-40%). Les autres types de cellules inflammatoires observées le sont en quantité négligeable ⁵⁶. *In vitro*, les macrophages équins stimulés produisent de l'IL-8 et MIP-2, médiateurs chimiotactiques puissants et spécifiques pour les neutrophiles. De fait, corrélée à l'augmentation de ces deux facteurs, la capacité chimiotactique pour les neutrophiles du surnageant de ces cultures augmente. D'autre part, la capacité de phagocytose de ces macrophages diminue, leur rôle de cellules "nettoyant" l'espace bronchoalvéolaire évolue vers un rôle immunomodulateur ¹².

- **Neutrophiles**

Chez les chevaux présentant les symptômes du souffle, on remarque une neutrophilie pulmonaire, traduite par une augmentation du pourcentage de neutrophiles, se développant 4 à 5 heures après contact avec les antigènes présents dans le foin et la paille ¹¹. Il existe une grande variabilité individuelle quant à l'importance de cette neutrophilie. De plus, une crise sévère n'est pas nécessairement accompagnée d'une neutrophilie plus importante et *vice versa* ^{3,11}. La migration des neutrophiles des vaisseaux sanguins jusqu'au site d'inflammation, ici les voies respiratoires, se nomme l'extravasation, et résulte d'une succession d'étapes pouvant se diviser comme suit :

- Margination, roulement et adhésion dans la lumière des vaisseaux sanguins,
- Passage à travers l'endothélium (diapédèse),
- Migration à travers le tissu interstitiel dirigée par les stimuli chimiotactiques.

Lors d'un phénomène inflammatoire, comme dans le souffle, les conditions hémodynamiques changent. Les leucocytes se disposent alors en périphérie de la colonne sanguine et les contacts avec l'endothélium vasculaire augmentent. Ce phénomène s'appelle la margination. Les cellules inflammatoires, se lient de façon transitoire à l'endothélium et progressent lentement à sa surface (c'est le roulement). Finalement les leucocytes s'arrêtent et adhèrent fermement à la paroi du vaisseau sanguin. Les cellules inflammatoires insèrent alors un pseudopode entre les cellules

endothéliales, se glissent entre les jonctions interendothéliales et traversent la membrane basale. Les récepteurs d'adhésions sont répartis en quatre familles, les sélectines (situées sur les cellules endothéliales ainsi que sur les leucocytes), les immunoglobulines (qui incluent deux molécules d'adhésions endothéliales : "Intercellular Adhesion Molecule" (ICAM)-1 et "Vascular Cell Adhesion Molecule" (VCAM)-1) qui interagissent avec les intégrines (présentes à la surface des leucocytes) et les glycoprotéines "mucine-like". En réponse à certains médiateurs de l'inflammation, l'augmentation d'affinité des récepteurs d'adhésions leucocytaires ainsi que celle du nombre de molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales, permettent aux leucocytes de se lier fortement aux cellules endothéliales, ce qui est nécessaire pour la diapédèse. Tous les leucocytes, dont les neutrophiles suivent les mêmes étapes pour migrer jusqu'au site d'inflammation. Le type de stimuli favorise la migration d'une population de leucocytes par rapport aux autres. Après l'extravasation, les leucocytes migrent à travers les tissus, vers le site atteint, en suivant un gradient chimique, ce phénomène est appelé le chimiotactisme. Les stimuli chimioattractifs peuvent être des molécules exogènes, comme des produits bactériens. Ils peuvent également être endogènes comme le C5a du complément, les produits de la lipoxigénase principalement les leukotriènes B₄ et certaines familles de cytokines dont les chimiokines (par exemple : IL-8)^{39,40}.

Plusieurs études cherchent à définir les différents stimuli aboutissant à la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle. Ainsi, entre les chevaux sains et les chevaux atteints du souffle en rémission, l'adhérence des neutrophiles circulants, après stimulation *in vitro*, ne présente aucune différence significative⁵⁷. Cependant, 24 heures après le début d'un challenge antigénique naturel, une augmentation significative de l'adhérence des neutrophiles sanguins est observée chez les chevaux alors cliniquement malades ; celle des chevaux normaux restant inchangée⁵⁷. L'augmentation de l'adhérence des neutrophiles sanguins après un challenge antigénique naturel dépend de l'intégrine $\beta 2$ qui est constitutionnellement exprimée à la surface des neutrophiles équins⁵⁷. L'exposition des chevaux atteints du souffle au foin et à la paille aboutit à l'activation des neutrophiles circulants, par un ou plusieurs facteurs, traduite par l'augmentation du nombre d'intégrines de surface ou de leur affinité pour son récepteur. La nature de ces facteurs et leur origine restent à définir⁵⁷.

D'autre part, les neutrophiles sont attirés dans les poumons par deux types de mécanisme, un spécifique et un non-spécifique. Le chimiotactisme non-spécifique pour les neutrophiles comprend l'effet directement neutrophilique des particules végétales, l'activation du complément C5a par le tissu lésé, ou la sécrétion de cytokines chimiotactiques par les macrophages alvéolaires ³. *In vitro*, les macrophages équins stimulés produisent de l'IL-8 et MIP-2, de puissants facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles ¹². Ce mécanisme non-spécifique pourrait expliquer l'augmentation légère du pourcentage de neutrophiles chez les chevaux contrôles soumis à un challenge antigénique ³.

Les chevaux atteints du souffle, mis en contact avec les allergènes présents dans le foin, développent une réponse immune spécifique où les cellules tels les lymphocytes produisent des cytokines contribuant au recrutement des neutrophiles dans leur poumon. Ainsi, les chevaux atteints du souffle soumis à un challenge antigénique naturel, voient leur niveau d'IL-8 augmenter dans les cellules des LBA, comparativement à leur niveau en rémission et à celui des chevaux contrôles ^{10,12,24}.

Par ailleurs, il a été démontré que les cellules inflammatoires présentes dans les poumons des chevaux atteints du souffle ont un profil cytokinique de type Th2, avec une augmentation de l'expression de l'IL-4, l'IL-5 et une diminution de l'expression de INF- γ ⁸⁻⁹. Or, l'IL-4 joue un rôle essentiel dans la production d'IgE par les lymphocytes B expliquant l'augmentation des taux sériques et pulmonaires d'IgE chez les chevaux atteints du souffle. Les conséquences de l'augmentation de l'expression de l'IL-5 sont, quant à elle, peu claires. En effet, l'IL-5 a une action habituellement éosinophilique et entraîne, chez l'humain asthmatique, une éosinophilie pulmonaire, ce qui n'est pas le cas des chevaux atteints du souffle ⁸.

L'absence d'augmentation d'éosinophiles dans les poumons des chevaux atteints du souffle peut s'expliquer par le rôle du NF- κ B. Chez les chevaux atteints du souffle, le NF- κ B est principalement un homodimère p65, en lieu et place de l'habituel hétérodimère p65-p50 ⁵⁸. Or, l'hétérodimère p65-p50 induit la production de facteurs chimiotactiques pour les éosinophiles tel l'eotaxine alors que l'homodimère p65 induit la production d'IL-8, quant à elle neutrophilique et surexprimée chez les chevaux atteints du souffle. De plus l'activité du NF- κ B est augmentée chez les chevaux atteints du

souffle et corrélée au pourcentage de neutrophiles. La diminution de l'hétérodimère p65-p50 et l'augmentation de l'homodimère p65 chez les chevaux atteints du souffle pourraient donc jouer un rôle dans l'apparition d'une neutrophilie, et non d'une éosinophilie, pulmonaire chez ces chevaux ^{8,10,24,59}.

Par ailleurs, le délai entre l'exposition aux allergènes et l'apparition des symptômes, l'apparition du bronchospasme, la surproduction de mucus et la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle donnent à penser qu'une réaction d'hypersensibilité semi-retardée intervient également dans la pathogenèse du souffle. Cette observation rappelle la réaction d'hypersensibilité semi-retardée observée chez les patients asthmatiques après challenge antigénique, caractérisée par le recrutement, l'activation, et l'infiltration pulmonaire d'éosinophiles ainsi que de neutrophiles et de lymphocytes ⁸. Dans le LBA des chevaux atteints du souffle, une augmentation des CD4+ a été constatée et le profil de cytokines produites par ces lymphocytes est de type Th2 ⁵⁻¹⁰. La sécrétion de telles cytokines ne peut expliquer le développement de la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle. Un des facteurs via lequel les CD4+ orchestreraient, indirectement, la neutrophilie pulmonaire pourrait être l'IL-17 (voir paragraphe : Interleukine 17, importance au niveau pulmonaire, page 24). En effet, lors d'expériences utilisant la souris comme modèle d'asthme allergique, l'IL-17 produite par les CD4+, s'avère être indirectement responsable d'une neutrophilie pulmonaire ²². Il a également été démontré que l'IL-17 est surrégulée dans les voies respiratoires des patients asthmatiques et induit les fibroblastes à produire d'autres cytokines proinflammatoires ²⁰. L'IL-17 stimule en effet l'excrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales des voies respiratoires et les macrophages ^{14,16,24}. Il serait donc intéressant d'investiguer le niveau de production d'IL-17 par les CD4+ dans le LBA des chevaux atteints du souffle.

Les neutrophiles sont capables de sécréter de l'élastase, des radicaux libres, des leukotriènes, des cytokines proinflammatoires (notamment IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , MIP-2) tous potentiellement nocifs pour le parenchyme pulmonaire. Il est donc probable que, chez les chevaux atteints du souffle, les neutrophiles aient un rôle dans le remodelage tissulaire des poumons tout comme chez les patients asthmatiques chroniques ^{8,13,60,61}.

D REMODELAGE TISSULAIRE

Le souffle est habituellement qualifié de maladie à caractère emphysémateux car les poumons ne se collapsent pas lors de l'ouverture de la cavité thoracique. Ce phénomène résulte plutôt de l'emprisonnement d'air par l'obstruction des voies respiratoires et non d'un réel emphysème³.

Le principal changement est observé au niveau des cellules ciliées des bronches affectées. Une perte focale de celles-ci, remplacées par des cellules indifférenciées au sein d'un épithélium hyperplasique est constatée⁵³. Des cils anormaux (notamment, épaississement des cils, désorganisation des micotubules, présence de plusieurs axonème dans un même cil) peuvent également être présents et ce, indépendamment du degré de sévérité de la maladie. Une dilatation de l'espace intercellulaire et une accumulation de mastocytes sont interprétées comme une évidence morphologique d'une hyperréactivité non-spécifique de la muqueuse⁵³.

Les principales modifications pathomorphologiques observées dans le souffle se situent dans les bronchioles et les alvéoles. Au niveau des bronchioles, les changements pathologiques sont focaux, mais diffus, même chez les animaux sévèrement atteints. Plusieurs zones peuvent donc ne présenter aucune modification. Une accumulation d'intensité variable de cellules inflammatoires où les neutrophiles prédominent est présente dans la lumière des bronchioles^{3,62,63}. La lumière des petites voies respiratoires peut être réduite par des accumulations de mucus, de neutrophiles ou des modifications de la paroi de ces voies respiratoires. En fonction de la sévérité de la maladie, une augmentation de la desquamation cellulaire, une nécrose de l'épithélium, une hyperplasie épithéliale, une infiltration péribronchique de cellules inflammatoires mononuclées, et la formation de follicules lymphoïdes sont observées⁶⁴. Finalement, une fibrose péribronchique s'étendant jusqu'aux septa alvéolaires voisins est présente chez les chevaux sévèrement atteints⁶⁴. Les cellules épithéliales non-ciliées bronchiolaires, dites cellules de Clara, sont particulièrement sujettes à des altérations y compris chez les animaux légèrement atteints. Ces cellules montrent des signes de dégénérescence et une diminution de leur différenciation traduite par une perte de leur

granulation et une métaplasie des cellules à gobelets. De plus, des inclusions cytoplasmiques lamellaires, dont le nombre augmente parallèlement à la sévérité des signes cliniques, sont observées. L'étude de Kaup suggère que "les cellules de Clara sont les cellules ciblées par les antigènes et les médiateurs de l'inflammation durant les changements bronchiolaires" ⁶⁴.

Dans la région alvéolaire, des altérations focales avec nécrose des cellules épithéliales de type I, fibrose alvéolaire accompagnée de transformations des cellules épithéliales de type II, emphysème ou hyperinflation alvéolaire et augmentation du nombre de pores de Kohn, peuvent être constatées. Ces modifications pathomorphologiques des alvéoles sont principalement observées autour des bronchioles remodelées.

L'hypothèse est donc que les changements tissulaires primaires entreprennent les bronchioles et s'étendent ensuite aux régions alvéolaires et aux bronches par continuité de tissus. Cependant aucune de ces observations ne nous éclaire quant à la pathogenèse de la maladie ⁶⁴.

5 ÉVALUATION DE LA FONCTION RESPIRATOIRE ET DE LA NEUTROPHILIE PULMONAIRE

Évaluer la fonction pulmonaire de chevaux atteints du souffle vise à quantifier l'obstruction respiratoire. Celle-ci permet de déterminer la sévérité du dysfonctionnement pulmonaire et d'effectuer un suivi objectif de l'évolution de la maladie. De nombreuses techniques évaluent la fonction respiratoire, notamment l'étude de la mécanique respiratoire, des gaz sanguins et de la ventilation via les tests de mesure d'une expiration forcée ou des volumes pulmonaires (mesure de la capacité résiduelle par dilution d'hélium). La fonction respiratoire peut également être investiguée en testant la diffusion par la mesure de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone ou enfin, en étudiant l'inégalité ventilation-perfusion par la méthode de la simple respiration (mesure de la concentration de N₂ lors d'une respiration), celle des respirations multiples (mesure de la vitesse d'élimination de N₂) ou encore par calcul du ratio ventilation-perfusion (mesure de la différence de Po₂ alvéolaire et artériel) ⁶⁵.

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) permettent de déterminer le type de cellules présentes dans la lumière des voies respiratoires et de les quantifier.

A MÉCANIQUE RESPIRATOIRE

La mécanique respiratoire permet de mesurer la résistance au passage de l'air dans les voies respiratoires et d'apprécier l'élasticité du tissu pulmonaire. Outre la technique de mécanique standard décrite ci-dessous, il existe d'autres façons d'évaluer la mécanique respiratoire, notamment d'une part, la pléthysmographie qui mesure les variations de pressions et de volumes en plaçant l'animal dans un local hermétiquement clos et, d'autre part, l'oscillation forcée, technique évaluant les réactions du système respiratoire à de légères pulsations d'air, réactions liées aux caractéristiques mécaniques de poumon^{65,66}.

La méthode standard mesure les variations de pression intrapleurale (ΔP_L) s à l'aide d'un ballonnet gonflé d'air placé dans l'œsophage, entre le cœur et le diaphragme, et relié par un tube de plastique rigide à un transducteur de pression. Simultanément, le débit d'air est mesuré par un pneumotachographe relié à un second transducteur de pression. Ces données sont intégrées par un ordinateur qui calcule différents paramètres dont la résistance pulmonaire (R_L), l'élastance (E_L) et la différence maximale de pression intrapleurale (ΔP_L)⁶⁷. La mécanique respiratoire est réalisée sur un animal conscient, non tranquilisé, et respirant spontanément. Cette technique est fréquemment employée dans notre laboratoire et nous donne des données répétables^{4,8,9,68-70}.

Une augmentation de la ΔP_L est observée chez les chevaux cliniquement atteints du souffle. Cependant cette augmentation ne traduit pas uniquement une bronchoconstriction, elle reflète également un changement de la stratégie respiratoire adoptée par le cheval. En effet, lorsque l'obstruction des voies respiratoires devient sévère, le cheval augmente sa ventilation minute (volume d'air expiré par minute) en augmentant la fréquence respiratoire tout en maintenant stable le volume courant (V_T , volume d'air expiré lors d'une respiration normale). L'inspiration typiquement biphasique chez les chevaux contrôlés devient une inspiration uniphasique avec un haut pic en fin d'inspiration, lorsque le diamètre des voies respiratoires est maximal. Toutefois, la stratégie respiratoire du cheval en crise est surtout modifiée lors de

l'expiration. En effet, le pic expiratoire augmente en début d'expiration pour diminuer de façon drastique en fin d'expiration, phase correspondant à l'effort abdominal fourni pour finir l'expiration. Cette stratégie permet d'expirer une partie importante du V_T avant le rétrécissement des voies respiratoires en fin d'expiration. ΔPL n'est donc pas un simple indicateur des changements de diamètre des voies respiratoires, son augmentation n'est pas proportionnelle au degré d'obstruction des voies respiratoires mais reste, malgré tout, un bon indicateur de la sévérité de la maladie chez les chevaux cliniquement atteints du souffle ⁷¹.

L'importance de l'obstruction des voies respiratoires est mieux reflétée par une augmentation de E_L et de R_L . Alors que, chez les chevaux atteints du souffle en rémission et chez les chevaux contrôles, l' E_L et la R_L ne sont pas significativement différentes, lors d'exacerbation clinique, on assiste à une augmentation de R_L et une diminution de E_L . Ces modifications reflètent l'obstruction diffuse des voies respiratoires ⁷¹. Cependant, ces modifications sont peu sensibles et ne dépassent les valeurs normales que lorsque l'obstruction est importante et cliniquement visible. Alors que le souffle est une pathologie atteignant les petites voies respiratoires, ces petites voies respiratoires contribuent normalement à moins de 20% de la R_L . La R_L représente la résistance des voies respiratoires au passage de l'air et également la résistance tissulaire. L' E_L traduisant les propriétés élastiques du poumon (E_L , variation du volume pulmonaire par unité de pression) et étant altérée par une distribution de la ventilation inégale, elle devrait être un meilleur indicateur du statut des voies respiratoires profondes ^{65,67}.

Bien que la mécanique respiratoire permette de quantifier l'obstruction respiratoire, de nombreux facteurs, comme les variations circadiennes, journalières, saisonnières ⁴, les différences de méthodologies, par exemple, la position de la tête du cheval, l'utilisation de tranquillisants ⁶⁸, la position du ballonnet dans l'œsophage, et l'espace mort du masque, peuvent modifier, de façon significative les résultats ⁶⁷. Il est donc nécessaire de standardiser la méthodologie, comme l'a fait notre laboratoire, afin de minimiser les facteurs extrinsèques de variations.

B GAZ SANGUINS

L'hypoxémie est constante chez les chevaux cliniquement atteints du souffle et s'aggrave avec la sévérité de la maladie ^{3,30,67}. Cette hypoxémie semble être due à l'inadéquation de la ventilation par rapport à la perfusion. En effet, une partie de la ventilation minute, augmentée, alimente des espaces morts créés par la diminution du débit sanguin des capillaires pulmonaires comprimés en raison du gaz-trapping ou de l'hyperinflation des alvéoles ³. Une hypercapnie peut également être présente ³. L'inconvénient majeur de cette méthode d'évaluation de la fonction respiratoire est le peu de répétabilité des résultats obtenus si les échantillons ne sont pas analysés dans les minutes suivant leur prélèvement (Lavoie, communication personnelle).

C DISTRIBUTION DE LA VENTILATION

Le lavage pulmonaire à l'azote au cours de respirations répétitives (LPAR) donne une indication sur l'efficacité de la distribution de la ventilation intrapulmonaire. Chez les chevaux atteints du souffle, alors que l'élimination de l'azote par la trachée et les bronches principales est semblable à celle chez les chevaux contrôles, l'élimination de l'azote par les alvéoles mal ventilées est fortement retardée par rapport aux chevaux contrôles. Le LPAR semble être un test sensible pour détecter des chevaux atteints du souffle de façon subclinique et permet de détecter la maladie chez les animaux ayant une E_L et R_L inaltérées. De plus les résultats semblent bien corrélés avec les données histopathologiques des petites voies respiratoires ^{3,66,72}.

D'autre part, la scintigraphie permet d'évaluer la distribution topographique du rapport ventilation sur perfusion. Chez les chevaux cliniquement atteints du souffle, l'inadéquation de ce rapport est fortement hétérogène et est prédominante dans les régions périphériques des poumons, régions des petites voies respiratoires et des alvéoles. Chez les chevaux atteints du souffle traités et ayant recouvert un statut clinique de rémission, la scintigraphie permet de mettre en évidence la rémanence de l'inadéquation du rapport ventilation sur perfusion et ce même en l'absence de symptômes cliniques ou d'hypoxémie ⁷³.

Ces techniques sont en pratique difficilement utilisables au vu du coût de l'équipement, des locaux requis et de l'expertise nécessaire à leur administration.

D LAVAGE BRONCHO-ALVÉOLAIRE ET ENDOSCOPIE

L'endoscopie permet d'évaluer et de qualifier les sécrétions bronchiques, l'œdème et l'hyperhémie de la muqueuse ainsi que le bronchospasme chez les chevaux atteints du souffle ⁶².

Le LBA est une procédure simple, répétable et sécuritaire utilisée en clinique pour évaluer des pathologies pulmonaires diffuses. Pour ce faire, un endoscope flexible est introduit dans les voies respiratoires jusqu'à ce qu'il atteigne une bronchiole de même diamètre. A travers le canal accessoire, de la saline isotonique, à température corporelle, est administrée dans les voies respiratoires. Le territoire pulmonaire en aval de la bronche à laquelle l'endoscope est abouché est donc "lavé". Le lavage est alors aspiré et conservé sur glace jusqu'à analyse.

Il a été démontré que, lorsque l'on répète le prélèvement dans plusieurs endroits du poumon, la cytologie des fluides récupérés, même en faible quantité, est identique. Donc, quel que soit le lieu du prélèvement, la cytologie obtenue est représentative de celle présente dans le poumon étudié ⁷⁴. L'analyse du LBA permet d'évaluer la flore microbienne et la proportion des différentes populations de leucocytes présents dans les petites voies respiratoires ⁶².

Chez les animaux sains et chez les chevaux atteints du souffle en rémission, la population cellulaire au niveau des alvéoles est constituée de macrophages (40-60%) et de lymphocytes (30-40%). Les autres types de cellules inflammatoires présentes le sont en quantité négligeable. Durant l'exacerbation de la maladie, une neutrophilie pulmonaire importante est observée ainsi qu'une augmentation de la quantité de mucus ^{52,56,62}. Des spirales de Curschmann, amas de mucus gardant l'empreinte des voies respiratoires profondes, peuvent être présentes ainsi que des cellules épithéliales ²⁹. L'utilisation d'une cytocentrifugeuse pour préparer les lames de cytologie des cellules du LBA permet une identification et un comptage optimaux de celles-ci ⁷⁵.

II L'INTERLEUKINE-17

Les cytokines sont des peptides qui, une fois sécrétés par la cellule, médient un très large panel d'activités biologiques par liaison spécifique avec un récepteur de surface présent sur la cellule cible. Leur potentiel d'action inclut le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, celui de la régulation de l'hématopoïèse et des réactions immunes et inflammatoires ⁷⁶.

L'IL-17 est une famille de cytokines proinflammatoires sécrétée majoritairement par les lymphocytes T CD4+. Jusqu'à ce jour, cinq cytokines appartenant à cette famille ont été mises en évidence: IL-17A ou IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17E ou IL-25 et IL-17F ⁷⁷⁻⁸⁰. Une forte similitude au niveau de la partie C-terminale est observée avec la présence de cinq résidus cystéines conservés spatialement chez les cinq membres de la famille de l'IL-17. Cependant la partie N-terminale varie fortement d'une cytokine à l'autre, contenant de un à quatre résidus cystéiques ⁷⁹. Leur structure, présentant deux ponts disulfures invariables est unique parmi les cytokines et protéines de mammifères connues ^{78,79}. La famille de l'IL-17 pourrait jouer un rôle important dans de nombreuses maladies médiées par une réponse immune anormale comme l'arthrite rhumatoïde, COPD et l'asthme, le psoriasis, le lupus érythémateux, de multiples scléroses chez l'homme. Cette famille de cytokines intervient également dans les phénomènes de rejets de greffes et dans l'immunité anti-tumorale ^{78,79,81,82}.

1 IL-17 OU IL -17A

A GÉNÉRALITÉS

Cytokine homodimérique de 32kDa, l'IL-17 comprend 23 acides aminés. La comparaison de la séquence de la protéine humaine avec celle des souris et des rats montre la conservation de six cystéines, un site de N-glycosylation et deux sites de phosphorylation. L'ARNm de l'IL-17 est détecté dans les cellules T CD4+ activées et plus spécifiquement dans les CD4+ cellules "mémoires" ¹⁶. La protéine peut être détectée par ELISA dans le surnageant de cultures de PBMC, et ce, 16 heures après

l'activation de ces cultures pour atteindre une concentration plateau après 48 heures ¹⁶. Il n'apparaît pas clairement si les cellules T CD8+ activées ont le potentiel de produire de l'IL-17. En effet, certaines études n'ont pu détecter la protéine dans le surnageant de cultures de cellules T CD8+ activées ¹⁶ alors que d'autres ont pu détecter de faibles niveaux d'IL-17 dans ces même types de cultures ⁸³. Une étude récente montre que les éosinophiles, sanguins et présents dans le LBA, semblent également être une source d'IL-17 ²⁰. Des études récentes effectuées dans notre laboratoire indiquent que les neutrophiles sanguins équins ne semblent pas en mesure d'exprimer l'IL-17.

L'IL-17 stimule, *in vitro*, la production de PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, de MCP-1, de NF- κ B et de G-CSF par de nombreuses cellules telles les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules épithéliales, notamment et endothéliales ainsi que les synoviocytes ^{16,79}. L'IL-17 provoque également une surrégulation de la production d'oxyde nitrique ainsi qu'une augmentation de niveau de l'ARNm de l'oxyde nitrique synthétase dans le cartilage ostéoarthritique ¹⁷. De plus, l'IL-17 semble promouvoir l'angiogenèse dans les modèles de tumeur et sa présence est bien corrélée avec le nombre de vaisseaux sanguins présents dans les cancers ovariens humains ¹⁷.

In vitro, l'IL-17 a des effets synergiques avec d'autres molécules proinflammatoires tels TGF- α pour stimuler la sécrétion de GM-CSF, CD40-ligand pour stimuler la sécrétion d'IL-6, IL-8, RANTES et MCP-1 par les cellules épithéliales rénales *in vitro* ¹⁶.

L'IL-23 semble surstimuler fortement la production d'IL-17 par des cellules T *in vitro*, et ce, de façon dose dépendante ⁸⁴. L'IL-23 est une cytokine récemment découverte et faisant partie de la famille de l'IL-12, famille jouant un rôle dans la régulation de l'immunité cellulaire ⁸⁵. Un profil cytokinique de type Th1, induit par IL-12 surstimule également la production d'IL-17 mais de façon très marginale. Cependant, l'IL-12 seule ne produit aucune modification de l'expression d'IL-17 ⁸⁴.

B IMPORTANCE AU NIVEAU PULMONAIRE

Plus spécifiquement, l'IL-17 semble impliquée dans la pathogenèse de pathologies respiratoires. Dans l'asthme allergique humain, l'inhalation d'allergène entraîne une réaction inflammatoire dans laquelle les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle central ^{1,22}.

Ces CD4⁺ activés sécrètent des cytokines de type Th2 contribuant aux phénomènes typiques se produisant lors d'asthme allergique, comme, par exemple, une production d'IgE spécifiques aux allergènes, hypersensibilité bronchique et infiltration d'éosinophiles. Bien que les éosinophiles soient majoritaires, l'importance du rôle des neutrophiles dans la pathogenèse de l'asthme allergique est de plus en plus étudiée. En effet ceux-ci participent à l'hypersécrétion bronchique, à l'hypersensibilité bronchique et au remodelage tissulaire. De plus, une neutrophilie pulmonaire a été rapportée dans les cas de crises d'asthme sévères et après un challenge antigénique chez des patients souffrant d'asthme. Expérimentalement, sur des rats servant de modèle d'asthme allergique, les CD4⁺ seraient essentiels à cette neutrophilie ²². L'IL-17 semble être un des médiateurs produits par les CD4⁺ responsables du recrutement des neutrophilies, de leur activation et de l'hypersécrétion de mucus ^{14,22}. Ainsi, lors de l'utilisation de souris comme modèle d'asthme allergique, l'IL-17 est surrégulée et nécessaire à la neutrophilie pulmonaire après un challenge antigénique, l'administration au préalable d'anticorps anti-IL-17 diminuant drastiquement cette neutrophilie ²². De plus, chez l'homme, le niveau d'expression de cette cytokine augmente en fonction de la sévérité de la maladie. En effet, alors que le niveau d'IL-17 est semblable dans les groupes contrôles et faiblement atteints, il augmente de façon significative dans les groupes modéré et sévère ^{20,26}. L'absence d'effet direct de l'IL-17 sur des cultures de neutrophiles laisse à penser que l'IL-17 agit indirectement sur ces neutrophiles par l'induction de sécrétions de médiateurs par d'autres cellules ²³. L'IL-17 induit la sécrétion de plusieurs C-X-C chimiokines par les cellules bronchiques épithéliales humaines. Lorsque l'IL-17 stimule ces cellules, elles sécrètent de l'IL-8, du GCP-2 (granulocyte chemotactic protein) et du GRO- α (growth related oncogen) tous trois potentiellement neutrophiliques ¹⁹. *In vivo*, l'IL-17, notamment via l'induction de sécrétions d'IL-8, IL-6 et MIP-2, est neutrophilique au niveau pulmonaire où une forte augmentation du pourcentage de neutrophile est observée dans le LBA de souris ayant préalablement été instillées avec de l'IL-17 par voie intra-trachéale ^{21,79,86}. Outre son potentiel chimiotactique, l'IL-17 semble également pouvoir activer indirectement les neutrophiles. L'instillation trachéale d'IL-17 sur des rats, suivit de LBA six heures plus tard, permettent de montrer non seulement une augmentation du pourcentage de neutrophiles mais également

l'augmentation de l'activité de l'élastase (ELA) et de la myeloperoxydase (MPO) toutes deux marqueurs de l'activation des neutrophiles ²³.

Le TNF- α , cytokine proinflammatoire augmentée dans les maladies obstructives des voies respiratoires, potentialise l'augmentation de C-X-C chimiokines induite par l'IL-17. IL-1 β est une autre cytokine proinflammatoire dont l'expression est augmentée dans les maladies obstructives des voies respiratoires. Cette cytokine, quant à elle, potentialise l'effet de l'IL-17 sur l'activation des neutrophiles ¹⁴. Il est intéressant de noter que, *in vitro*, TNF- α et IL-1 β sont sécrétés par les macrophages stimulés avec de l'IL-17 ⁸⁷. L'IL-17 est également capable d'induire l'expression d'ICAM-1, la prolifération des lymphocytes T, et, de façon indirecte, la maturation et la différenciation des progéniteurs humains CD34+ en neutrophiles lorsqu'ils sont mis en culture avec des fibroblastes. Ces fibroblastes sécrètent de l'IL-6 et du G-CSF qui stimulent ces CD34+. L'IL-17 stimule également la production, par les fibroblastes bronchiques, du GRO- α potentiellement chimiotactique pour les cellules T, particulièrement les CD45RO+ mémoire CD4 qui sécrètent l'IL-17. Sur ces mêmes cultures, l'IL-17 stimule la production d'IL-11 qui, tout comme IL-6, est profibrotique ²⁰.

Enfin, *in vitro* sur des cultures de cellules épithéliales de voie respiratoire de souris, de singes, et humaines, l'IL-17 serait, avec l'IL-6, une des seules cytokines capables de stimuler l'expression des gènes responsables de la synthèse du mucus, MUC5B et MUC5A et ce, de façon dose dépendante. Au niveau des voies respiratoires, ces gènes sont responsables de l'expression et la production de glycoprotéines composant le mucus. Or l'hypersécrétion de mucus est caractéristique de maladies, comme l'asthme et le COPD chez l'homme et le souffle chez le cheval, et augmente leur morbidité et mortalité ²⁸.

2 IL-17B

Cytokine de 20,4 kDa et de 184 acides aminés, 27% des acides aminés sont conservés par rapport à IL-17 ⁷⁶. La partie C-terminale de la protéine, composée de six des huit cystéines de l'IL-17B est spatialement identique à la partie C-terminale de l'IL-17. Cependant la partie N-terminale ne l'est pas ^{76,77,88}. L'ARNm de l' hIL-17B (800pb) a été

détecté par northern blot avec un signal particulièrement fort au niveau de la moelle épinière, de l'intestin grêle et des testicules; un signal moins prononcé a également été mis en évidence dans la prostate, de la muqueuse du côlon et dans les ovaires. L'ARNm a également pu être mis en évidence au niveau du pancréas, de l'estomac, de la trachée, de l'utérus, des surrénales, de la substantia nigra et du tissu rénal fœtal ^{76,88}. D'autre part, la présence d'ARNm de l'IL-17B a été mise en évidence dans les chondrocytes par northern blot et par RT-PCR, ainsi que la présence de la protéine par immunohistochimie ¹⁷.

L'IL-17B stimule la production de TGF- α et de IL-1 β par les cellules THP-1 (human leukemic monocytic cell line) alors que l'IL-17 a un très faible effet sur ces cellules. D'autre part, elle n'augmente pas la production d'IL-6 par les fibroblastes cutanés comme le fait l'IL-17. Elle ne semble pas se lier au récepteur IL-17R ⁸⁸. *In vivo*, l'injection d'IL-17B intrapéritonéale est suivie, de façon dose dépendante, d'un influx de neutrophiles dans la cavité péritonéale après quatre heures ⁷⁶. Cependant, la présence du récepteur IL-17BR n'ayant pas pu être mise en évidence au niveau des neutrophiles, l'action de l'IL-17B semble indirecte. Au niveau du cartilage, la stimulation du récepteur IL-17RH1 par l'IL-17B entraîne l'activation NF- κ B. ¹⁷.

3 IL-17C

Par rapport à IL-17, 27% des acides aminés de l'IL-17C sont conservés ainsi que la partie C-terminale de la protéine, alors que la partie N-terminal ne l'est pas. L' ARNm de l'IL-17C n'a pu être détecté que rarement dans la prostate humaine et le tissu rénal fœtal. Elle stimule la production de TGF- α et de IL-1 β par les cellules THP-1 (human leukemic monocytic cell line). D'autre part, elle n'augmente pas la production d'IL-6 par les fibroblastes cutanés. Elle ne semble pas se lier à l'IL-17R ^{77,80,88}.

4 IL-17F

Par rapport à l'IL-17, l'IL-17F contient une paire de *cys-cys* supplémentaire pouvant correspondre à un pont disulfure supplémentaire et 50% ces acides aminés sont conservés ^{78,80}. Comme l'IL-17, elle est sécrétée par les cellules T activées ⁸⁰. Une faible quantité d'ARNm a pu être mise en évidence dans les CD4+ et CD8+ non stimulés ⁸⁰.

L'ARNm est fortement exprimé par les cellules T CD8⁺ et CD4⁺ activés. Cependant, d'après Starnes en 2001 ⁷⁸, l'ARNm de IL-17F n'est exprimé que par les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes activés. L'IL-17F provoque la sécrétion, *in vitro*, d'IL-8 et de G-CSF par plusieurs lignées cellulaires dont les fibroblastes cutanés humains. Comme l'IL-17, elle diminue le renouvellement de la matrice cartilagineuse. L'IL-17F induit également une surexpression d'IL-6 par les cellules de la matrice cartilagineuse mais moins que l'IL-17 ⁸⁰. De façon surprenante, l'IL-17F ne se lie pas aux IL-17R, ni aux IL-17RH1 ⁸⁰. Par ailleurs, l'IL-17F semble inhiber l'angiogénèse ⁷⁸. L'IL-17F stimule la production de TGF- β 1, de TGF- β 2, de monocyte chemoattractant protéine-1, de lymphotoxine- β et d'IL-2 par les cellules endothéliales ⁷⁸. L'IL-17F stimule indirectement la prolifération de progéniteur hématopoïétique par production de G-CSF et GM-CSF par les cellules accessoires de la moelle ⁷⁸. *In vivo*, l'IL-17F est neutrophilique notamment au niveau pulmonaire où une forte augmentation du pourcentage de neutrophiles est observée dans le LBA de souris ayant préalablement été instillées trachéalement avec de l'IL-17F ⁷⁹. Chez ces souris, l'analyse des niveaux d'ARNm provenant des cellules récupérées lors du LBA montre que l'IL-17F stimule l'expression de l'IL-6, du INF- γ , de la protéine inflammatoire 10 aboutissant à une réponse de type Th1 et à la neutrophilie pulmonaire ⁷⁹. Le niveau de l'ARNm d'IL-17F est, comme l'IL-17, augmenté en réponse à l'IL-23 *in vitro* ⁸⁴.

5 IL-25 OU IL-17E

L'IL-25 ne présente que 15% d'homologie avec la séquence de l'IL-17 ⁷⁹. L'expression de l'ARNm de l'IL-25 a été détectée dans les cellules T de type Th2 mais pas sur des CD4⁺ natifs et non-polarisés. Les activités biologiques, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, de l'IL-25 sont très différentes de celles des autres membres de la famille IL-17. Administrée par voie intrapéritonéale chez des souris, l'IL-25 induit la sécrétion de cytokines (IL-4, IL-5, IL-13), à une éosinophilie ainsi qu'à une augmentation des IgE, IgG₁ et IgA sériques, caractéristiques d'une réponse inflammatoire de type Th2. Des changements histologiques pulmonaire et gastro-intestinal ont été observés, notamment l'infiltration d'éosinophiles, l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules épithéliales et des cellules à gobelets avec une augmentation de la production de mucus ⁸⁹. De même, une

forte augmentation du pourcentage d'éosinophiles est observée dans le LBA de souris ayant préalablement été instillées trachéalement avec de l'IL-25 ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de mucus. Chez ces souris, l'analyse des niveaux d'ARNm provenant des cellules récupérées lors du LBA montre que l'IL-25 stimule l'expression de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 ⁷⁹. D'autre part, l'IL-25 est surexprimée lors d'infections par *A.fumigatus* et *N.brasiliensis* ⁷⁹.

6 RÉCEPTEURS

A LE RÉCEPTEUR DE L'IL-17 (IL-17R)

L'IL-17R ne présente aucune homologie avec les récepteurs d'autres cytokines connus. Il est distribué de façon ubiquitaire ^{16,78}. Par Northern blot, l'ARNm de l'IL-17R a été détecté dans tous les tissus testés. Les signaux obtenus sont maximaux dans les reins et la rate, modérés dans le poumon et le foie, et faibles dans le cerveau, les testicules, le cœur et les muscles squelettiques. Ce même mRNA a pu être détecté dans toutes les lignées cellulaires testées (cellules épithéliales de foie fœtal, cellules épithéliales intestinales de rats, fibroblastes, cellules musculaires, mastocytes, cellules B spléniques, cellules pré-B, thymocytes triple-négatifs, cellules-T thymiques, et clones de cellules-T) ¹⁶. L'activation de ce récepteur par l'IL-17 aboutit à la libération d'autres cytokines pro-inflammatoire ¹⁷. Actuellement, l'expression de ce récepteur par les macrophages et neutrophiles n'a pas encore été démontrée.

B IL-17RB OU IL17RH1

Par Northern blot, l'ARNm de l'hIL-17BR a été détecté dans les tissus humains suivants : multiples tissus endocriniens, tissus hépatiques fœtal et adulte (signal le plus important), reins, pancréas, testicules, colon, intestin grêle, cartilage. Ce récepteur est par ailleurs absent des leucocytes sanguins périphériques et des organes lymphoïdes ⁷⁶. L'IL-17 a une faible affinité pour ce récepteur alors que l'IL-17B et l'IL-25 s'y lient de façon relativement forte ^{17,76}.

Chapitre III : Méthodologie

I CHEVAUX

Huit chevaux (moyenne d'âge : 12 ans) de races différentes ont été utilisés dans cette étude. Quatre d'entre eux faisaient partie de notre troupeau de chevaux atteints du souffle et avaient présenté, au cours de projets précédents, une obstruction respiratoire réversible lorsqu'ils étaient exposés au foin. Les quatre autres chevaux n'avaient aucune histoire ni symptôme de pathologie respiratoire.

N ^o Chevaux	Sexe	Age (années)	Race	Poids (Kg)	Groupe
53	femelle	8	Croisé	460	contrôle
68	femelle	13	Standardbred	482	contrôle
84	femelle	10	Standardbred	450	contrôle
102	femelle	16	Croisé	450	contrôle
103	femelle	12	Quaterhorse	462	souffle
123	femelle	15	Standardbred	516	souffle
305	femelle	13	Croisé	471	souffle
306	femelle	13	Quaterhorse	452	souffle

Tableau I Descriptifs des chevaux (sexe, âge, race, poids, groupe)

Avant le début de l'étude, les chevaux ont été gardés, ensemble, plus de trois mois au pâturage. Les chevaux atteints du souffle étaient donc en rémission clinique au moment du début de l'étude. Tous ont été soumis à un même programme de vaccination et de vermifugation. Par la suite, les chevaux ont été gardés pendant 35 jours dans la même écurie peu ventilée, sur paille et nourris avec du foin de pauvre qualité et de la moulée. Du foin moisi a été secoué dans chaque box une fois par jour au cours des deux premières semaines puis deux fois par semaine afin de s'assurer de l'apparition des signes cliniques.

II ÉVALUATION DE LA FONCTION PULMONAIRE

1 MÉCANIQUE RESPIRATOIRE

Un masque en fibre de verre rigide est posé sur le nez du cheval. Celui-ci est dessiné pour ne pas créer d'obstruction des narines. Afin d'assurer l'étanchéité du masque, il se termine par du caoutchouc maintenu parfaitement contre la peau du cheval à l'aide de bande adhésive. Une ouverture située au niveau des narines du cheval permet d'y positionner un pneumotachographe (Fleisch No. 4, Oem Medical, Richemond, Va., USA) associé à un transducteur de pression (Model 143PC03D, Micro switch, Honeywell, Scarborough, Ontario, Canada.) mesurant le débit d'air. Le pneumotachographe est chauffé afin d'éviter la condensation sur ces lamelles et une perte de linéarité du signal.

La pression œsophagienne, représentant la pression transpulmonaire, est mesurée via un ballonnet scellé à l'extrémité d'un cathéter et connecté à un transducteur de pression (Model HCXPM005DV6V, Sensor Technics, Newport News, Va, USA). Le ballonnet est positionné dans l'œsophage entre le cœur et le diaphragme, où un maximum de variation de pression et un minimum d'artefacts cardiaques sont observés. La pression atmosphérique présente dans le masque est également mesurée par le même transducteur de pression. Le transducteur de pression et le pneumotachographe sont reliés à un ordinateur possédant une carte d'acquisition spécialisée. Le programme (Anadat and Labdat 5.1, RHT-infodat, Montréal, Québec, Canada) calcule, à partir des signaux de débit et de changement de pression transpulmonaire (ΔP_L), la fréquence respiratoire, le volume courant (V_T), la ventilation minute (V_E), la résistance pulmonaire (R_L) et l'élastance (E_L) pour chaque cycle respiratoire, et ce, pendant 90 secondes. Lors de la prise de mesure, le cheval est placé dans un travail, n'est pas tranquilisé et sa tête est maintenue manuellement en position physiologique. Afin de s'assurer que les chevaux restent calmes pendant les manipulations, nous les avons entraînés avant le début de l'étude.

2 LAVAGE BRONCHO-ALVÉOLAIRE (LBA)

Les chevaux sont préalablement tranquilisés par administration intraveineuse de xylazine (Rompun, Bayer Inc, Toronto, Ontario, Canada) (150-250 mg) et de 10 mg debutorphanol (Torbugesic, butorphanol tartare injection, Wyeth Animal Health, Guelph, Ontario, Canada). Un fibroscope est introduit par un des naseaux et dirigé dans la trachée. En début d'étude, nous avons déterminé qu'aucune anomalie des voies respiratoires supérieures n'étaient présentes lors du passage du fibroscope. A partir de la carina, les voies respiratoires sont anesthésiées localement par instillation d'environ 60 ml d'une solution de lidocaïne 2% (Xylocard, Astra Pharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada) diluée quatre fois dans de l'eau stérile à travers le canal accessoire du fibroscope afin de diminuer le réflexe de toux. Le fibroscope est avancé dans les voies respiratoires jusqu'au moment où il atteint une voie respiratoire de même diamètre. Une légère pression est maintenue constamment sur le fibroscope afin d'assurer l'étanchéité entre celui-ci et la bronche. Une pochette de 250 ml de saline 0,9%, préchauffée à 37 °C, est alors infusée, sans pression, à travers le canal accessoire du fibroscope, dans les voies respiratoires inférieures. Dès la fin de l'administration, la solution est aspirée grâce à une pompe à suction créant une pression négative de 50 à 100 mm de Hg. Le lavage bronchoalvéolaire est alors recueilli, via des tubulures stériles, dans une bouteille en verre siliconée lavée auparavant à l'aide de virkon® (Vetoquinol ca, Joliette, Canada) et d'alcool 75% puis rincée avec de l'eau distillée. Le lavage broncho-alvéolaire est gardé sur glace dès sa récolte jusqu'à l'étape finale de l'isolement de ses cellules. Une deuxième pochette de saline est infusée immédiatement après la récolte de la première, et récupérée par le même procédé sans que la position du fibroscope n'ait été modifiée. Entre chaque LBA, l'extérieur du fibroscope est nettoyé avec de l'Endozyme® (Ruhof, Corporation, Bio-Med division, Mineola, NY, USA) et rincé. Le canal accessoire est brossé, également nettoyé avec de l'Endozyme® et rincé soigneusement avec de l'eau distillée. Des tubulures stériles et une bouteille propre sont utilisées pour chaque lavage.

III RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS

Le LBA est filtré à travers une couche de gaz stérile afin d'éliminer le mucus en suspension puis centrifugé à 4°C (5 minutes à 2000 rpm). Le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de PBS lors d'un premier lavage et centrifugé comme précédemment. Un deuxième lavage des cellules est effectué de la même façon. Le nombre de cellules est compté en utilisant un hémacytomètre (Neubauer improved, Lafontaine, Tiefe Depth, profondeur 0,1 mm; 0,0025 mm²). Par la même occasion, le pourcentage de cellules viables est également apprécié par un test d'exclusion au bleu trypan. Les cellules sont alors centrifugées une nouvelle fois et resuspendues dans du PBS de manière à obtenir une concentration de 10⁷ de cellules par ml de PBS. Deux aliquots de 1 ml de PBS contenant chacun 10⁷ de cellules, sont prélevés et transférés dans deux eppendorfs de 1,5 ml. Après une centrifugation de 5 minutes à 1500 rpm, les culots de cellules sont resuspendus dans 1 ml de Trizol[®] (Life Technologies, GIBCO, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada) et homogénéisés soigneusement. Dans l'heure suivant leur récolte, les cellules sont alors préservées à -80°C jusqu'à analyse.

Avec l'excédent de cellules, deux lames de cellules, sont préparées (Cytospin model II, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) afin d'effectuer un comptage différentiel de chaque population cellulaire. Une des lames est colorée au Dift-Quick et sa qualité évaluée immédiatement. L'autre est colorée ultérieurement au West Cor, afin de rendre les mastocytes identifiables. Le comptage cellulaire est alors effectué sur 400 cellules.

IV DESIGN DE L'ÉTUDE.

L'évaluation de la fonction respiratoire et la récolte des échantillons ont été réalisées deux fois sur chaque cheval. Les chevaux étaient au pâturage ensemble depuis plus de trois mois lors de la première évaluation. Ils ont été rentrés dans la salle d'examen le temps d'effectuer la mécanique respiratoire et LBA, puis ils ont directement été remis au pâturage. Une deuxième évaluation de leur fonction respiratoire a été réalisée 35 jours après avoir rentré ces chevaux à l'écurie.

V ANALYSES STATISTIQUES

Les différences entre les groupes ont été comparées statistiquement à l'aide de tests non-paramétriques (test de "Man-Whitney" et de "Wilcoxon signed rank"). Les différences sont considérées comme significatives pour p inférieur ou égal à 0,05.

VI EXTRACTION DE L'ARNM ET SYNTHÈSE DE L'ADNC

1 EXTRACTION

L'ARN provenant des cellules des LBA conservées dans le Trizol[®] (Life Technologies, GIBCO, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada), a été extrait suivant les instructions du manufacturier. L'ARN est séparé de l'ADN génomique et des protéines par addition de 200 μ l de chloroforme (Sigma-Aldrich Co, Oakville, Ontario, Canada) suivie d'une centrifugation. Après avoir été prélevé, l'ARNm est précipité en ajoutant 500 μ l d'Isopropanol[®] (Sigma-Aldrich Co, Oakville, Ontario, Canada) et en centrifugeant l'échantillon. L'ARNm est ensuite lavé à l'éthanol 75% (Sigma-Aldrich Co, Oakville, Ontario, Canada), centrifugé et resuspendu dans de l'eau stérile exempte d'DNA/RNA. La concentration de l'échantillon et sa pureté sont évaluées par spectrophotométrie. Les échantillons sont conservés à -80°C.

2 SYNTHÈSE DE L'ADNC (RT)

L'ADNC est synthétisé à partir d'1µg d'ARNm. Le volume d'ARNm est ajusté à 9 µl avec de l'eau stérile exempte d'DNA/RNA. Ces 9 µl sont alors chauffés 5 min à 70°C. 1 µL d'oligo(dT)12-18 primer (Life Technologies, GIBCO, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada) est ajouté et l'échantillon maintenu 10 min à 70°C puis remis sur glace. Durant ces 10 minutes, un mélange composé de 10,5µl d'eau stérile DNA/RNA libre, 7,2µl de buffer RT 5X (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada), 2,4µl de DTT 1M (Life Technologies, GIBCO, Burlington, Ontario, Canada), 1,5µl de dNTP 25mM (100mM dNTP set PCR Guard™; Life Technologies, GIBCO, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada), 1,2µl d'enzyme reverse-transcriptase (Reverse Transcriptase AMV, Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) et 1,2µl d'enzyme ribonuclease inhibitor (RNAguard™, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, Ontario, Canada), est préparé; 20µl de ce mélange sont déposés dans l'échantillon d'ARNm et celui-ci est incubé durant une heure à 50°C. Ensuite, la réaction est arrêtée en chauffant l'échantillon durant une minute à 100°C, ce qui inactive les enzymes. L'ADNC ainsi formé est conservé à -20°C.

VII QUANTIFICATION RELATIVE DE L'ADNC

L'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été étudiée sur les échantillons de cellules pulmonaires prélevés au pâturage et après 35 jours de stabulation. CD3-zeta, un marqueur des lymphocytes, a été utilisé comme gène domestique. CD3-zeta permet de corriger la mesure d'IL-17 pour le nombre de lymphocytes présents dans l'échantillon, afin d'avoir une mesure relative de la quantité d'ARNm d'IL-17 produite par lymphocyte⁴².

Des amorces spécifiques pour l'IL-17 ont été dessinées de manière à différencier l'amplification d'ADN génomique de l'amplification du gène recherché. L'ARNm de l'IL-17 équine avait été préalablement cloné et séquencé dans notre laboratoire (Genbank # AY014959, Joubert 2001). Les amorces de CD3-zeta nous ont été fournies par le Dr Horohov (University of Kentucky)⁴².

IL-17	Sens 5'-CTA CCT TCC CTT CGG CAT-3'	153 bp
	Antisens 5'-ACC TAA ACG TCC TTA ACC G-3'	
CD3-zeta	Sens 5'-AGA GGA GTA TGA CGG CAT CG-3'	234 bp
	Antisens 5'-GCA TCG TAG GTG TCC TTG GT-3'	

Tableau II Amorces spécifiques pour IL-17 et CD3zeta

Les PCR ont été effectuées en utilisant le LightCycler™ (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) avec du DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Le SYBR Green se lie aux molécules d'ADN bi caténaire et émet un signal fluorescent, proportionnel à la quantité de produit de PCR, qui est mesuré en fin de chaque cycle. Le calcul de la concentration d'un échantillon est basé sur le nombre de cycles nécessaires pour obtenir un premier signal détectable plutôt que sur la quantité de produit de PCR accumulé après un nombre de cycles arbitrairement défini ⁹⁰. Une courbe standard est construite pour chaque produit que l'on veut mesurer. Pour ce faire, le produit d'une PCR, après résolution sur gel d'agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Life Technologies, GIBCO, Burlington, Ontario, Canada) afin de s'assurer du poids moléculaire, est extrait (gel extraction kit, Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) et sa concentration mesurée par spectrophotométrie. Ce produit est alors dilué dans de l'eau stérile par un facteur 10, 11 fois successivement (concentration de 10^{-1} à 10^{-11}). Ces standards contiennent donc des concentrations d'ADN connues servant de référence au LightCycler™ (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) qui va déterminer les concentrations d'ADNc des échantillons analysés en fonction de la droite dessinée par les standards. Les concentrations présentes dans nos échantillons d'intérêts seront donc toujours relatives aux concentrations standards que l'on inclut dans chaque PCR ⁹⁰. Toutes les données provenant des PCR sont transmises vers un ordinateur et analysées par le logiciel prévu à cet effet (Lightcycler software version 3.5). Les options choisies pour l'analyse des résultats sont la méthode des "Fit Point" avec 6 points, avec ajustement arithmétique de la ligne de base, le coefficient de corrélation de la droite de régression tracée pour les standards doit être maximale ($r=1$) et l'erreur minimisée.

Pour chaque PCR, un mélange est préparé sur glace en respectant les directives du fabricant. Chaque constituant provient du kit LightCycler™ Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada).

Produit		Quantité	Concentration finale
H ₂ O		13,4 µl	
MgCl ₂ 25 mM		1,6 µl	3 mM
3' amorce	5 µM pour CD3zeta	1 µl (de chaque amorce)	0,25 µM (de chaque amorce)
5' amorce	20 µM pour IL-17	1 µl (de chaque amorce)	1 µM (de chaque amorce)
DNA Master SYBR Green I		2 µl	

Tableau III Mélange utilisé pour un échantillon lors d'une PCR en temps réel

Le volume final est donc de 19 µl par échantillon. Le DNA Master SYBR Green I contient les nucléotides, le tampon et l'enzyme (Taq DNA polymerase). 1 µl d'ADNc est alors ajouté et l'échantillon transféré dans un capillaire de glace spécifique pour le LightCycler™ (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Les capillaires sont maintenus à 4°C dans un bloc réfrigérant, centrifugés (5 sec, 800 rpm) puis placés dans la machine. Le LightCycler™ (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) est alors programmé de la même façon pour l'IL-17 et CD3-zeta (Tableau I, II et III), chaque PCR contient 45 cycles et se complète en 40 minutes approximativement.

Paramètre	Valeur
Display Mode	F1
Cycle	1
Analysis Mode	None
Target Temperature (°C)	95
Incubation Time (h:min:s)	10:00
Temperature Transition Rate (°C /s)	20
Acquisition Mode	None

Tableau IV Programme lightcyler, phase 1 : Dénaturation

Paramètre	Valeur		
Display Mode	F1		
Cycle	45		
Analysis Mode	Quantification		
	Segment 1 Denaturation	Segment 2 Annealing	Segment 3 Elongation
Target Temperature (°C)	95	57	72
Incubation Time (h:min:s)	0	5	12
Temp. Transit. Rate (°C /s)	20	20	5
Acquisition Mode	None	None	Single

Tableau V Programme lightcyler, phase 2 : Amplification

Paramètre	Valeur		
Display Mode	F1		
Cycle	1		
Analysis Mode	Quantification		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	57	95
Incubation Time (h:min:s)	0	12	0
Temp. Transit. Rate (°C /s)	20	5	0,2
Acquisition Mode	None	None	Step

Tableau VI Programme lightcycler, phase 3: Courbe des températures (Melting curve)

Paramètre	Valeur
Display Mode	F1
Cycle	1
Analysis Mode	None
Target Temperature (°C)	40
Incubation Time (h:min:s)	30
Temperature Transition Rate (°C /s)	20
Acquisition Mode	None

Tableau VII Programme lightcycler, phase 4 : Refroidissement (Cooling)

Ces protocoles ont été optimisés pour amplifier et quantifier l'IL-17 et CD3zeta avec les amorces spécifiques décrites auparavant. Après la première amplification, l'échantillon est récupéré et transféré sur un gel d'agarose 1% (Agarose Ultra Pure, Life Technologies, GIBCO, Burlington, Ontario, Canada) additionné de bromure d'éthidium 5%. Une électrophorèse (60V, 250 mA) a permis de faire migrer l'échantillon et de séparer les bandes de poids moléculaires différents. Aussi bien pour l'IL-17, que pour CD3zeta, une seule bande correspondant au poids attendu était visible.

Afin de s'assurer de la répétabilité des données obtenues par PCR en temps réel, chaque mesure a été reproduite deux fois. La moyenne des deux valeurs obtenues est utilisée dans les calculs statistiques.

Clinical exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin (IL)-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells.

Marie Debrue¹, Emma Hamilton ¹, Philippe Joubert ², Stéphane Lajoie-Kadoch ²,
Jean-Pierre Lavoie ¹.

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S7C6, Canada

² Meakins-Christie Laboratories, McGill University, 3626 Rue St-Urbain, Montreal, Quebec H2X 2P2

Corresponding author: Dr. Jean-Pierre Lavoie
Department of Clinical Sciences
Faculty of Veterinary Medicine
University of Montreal
3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe
Quebec, J2S7C6, Canada.
Phone (514) 345-8521#8292,
Fax (450) 778-8102
[REDACTED]

Submitted in *Veterinary Immunology and Immunopathology* journal.

Abstract

Recent finding suggests that T helper (Th)2-type cytokines may be involved in the pathogenesis of heaves in horses. However, little is known concerning the possible contribution of Th2-type cytokines to pulmonary neutrophilia, a characteristic finding in heaves. Interleukin (IL)-17 is a cytokine secreted by activated T-cells that indirectly promotes the maturation, chemotaxis and activation of neutrophils. We therefore hypothesized that IL-17 may be involved in the recruitment of neutrophils into the airways and that its mRNA expression would be increased in bronchoalveolar lavage (BAL) cells of horses with heaves.

To test that hypothesis, we studied heaves susceptible horses ($n = 4$) and control horses ($n = 4$) when in pasture (clinical remission) and after 35 days of continuous exposure to moldy hay. BAL and respiratory mechanics measurements were performed at both time periods. The mRNA expression of IL-17 in BAL was studied using real-time polymerase chain reaction (PCR) and CD3-zeta was used as housekeeping gene to correct for the variation of T-cell numbers.

There was no significant difference in IL-17 mRNA expression between groups of horses while in pasture. However, stabling resulted in an increased expression of IL-17 in horses with heaves but not in control horses ($p < 0.05$).

These preliminary results suggest that IL-17 may contribute in the pathogenesis of horses with heaves following chronic antigen challenge.

Keywords

Recurrent airway obstruction; IL-17; Lung; Neutrophils; Cytokine; Horses.

Abbreviations

BAL	Bronchoalveolar lavage
ΔP_L	Maximal changes in transpulmonary pressure
P_L	Transpulmonary pressure
R_L	Pulmonary resistance
E_L	Pulmonary elastance
RT	Reverse transcriptase
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease

Introduction

Heaves, also known as recurrent airway obstruction, is a common disease of horses characterized by lower airway inflammation, reversible airflow obstruction, bronchial hyperresponsiveness and increased mucus production (Robinson et al., 1996). Heaves can be induced in susceptible horses by inhalation of dust from moldy hay and clinical remission is observed when the horses are maintained in pasture (Robinson et al., 1996; Jean et al., 1999). This finding led researchers to postulate that heaves results from an allergic reaction to inhaled moulds and fungi (Robinson et al., 1996). In patients with allergic asthma, a condition that shares many features with heaves, the inflammatory response has been shown to be driven by activated CD4⁺ T cells secreting Th2-type cytokines (Robinson et al., 1992). A similar process may be implicated in heaves since a predominant Th2-type cytokine profile has been reported to be expressed by pulmonary lymphocytes of affected horses (Lavoie et al., 2001; Cordeau et al., 2004). However, whilst eosinophils are usually found in Th2-type responses, it is neutrophils that infiltrate the airways of horses with heaves (Fairbairn et al., 1993). The mechanisms that lead to neutrophil recruitment in Th2-type response remain ill defined.

IL-17 is a novel cytokine that could lead to tissue neutrophilia following T cell activation (Yao et al., 1995a; Fossiez et al., 1998; Linden et al., 2000; Linden and Adachi, 2002; Moseley et al., 2003). IL-17 has been found to be elevated in numerous inflammatory conditions and diseases mediated by abnormal immune responses including rheumatoid arthritis, lupus erythematosus, psoriasis, allergic contact dermatitis and gram-negative bacterial pneumonia (Albanesi et al., 2000; Wong et al., 2000; Starnes et al., 2001; Aggarwal and Gurney, 2002; Happel et al., 2003; Hellings et al.,

2003). Furthermore, IL-17 is required for neutrophil influx into airways following allergen inhalation (Hellings et al., 2003). Moreover, IL-17 expression is significantly increased in the airways of patients with asthma in comparison with control subjects and is correlated with airway hypereactivity (Molet et al., 2001; Chakir et al., 2003).

The purpose of this study was to determine whether, after a prolonged exposure to moldy hay, horses with heaves in clinical exacerbation present an increased expression of IL-17 mRNA in the bronchoalveolar cells in comparison with healthy horses.

Materials and Methods

Horses

Eight adult mares (age range 8-16 years; weight range 450-516 kg) were studied. There were 3 Standardbreds, 2 Quarter Horses and 3 Crossbred horses. Four horses were part of a herd of heaves affected animals and had history of reversible airways obstruction when exposed to moldy hay. Control horses ($n = 4$) had no history or clinical signs of respiratory disease.

All horses had been pastured together four months prior to the beginning of the study. They were vaccinated and dewormed regularly and were stabled in the same barn for the duration of the study. Horses were fed with hay and grain twice a day and were bedded on straw. Moldy hay was shaken in each of the horse's box twice daily starting two weeks before and for the duration of the study.

Pulmonary function test

A mask, designed to avoid obstruction of the nostrils, was placed over the horse's nose and sealed with a rubber shoulder. Flow rates were obtained from a heated pneumotachograph (Fleisch No. 4, Oem Medical, Richmond, Va., USA) associated to a differential pressure transducer (Model 143PC03D, Micro switch, Honeywell, Scarborough, Ontario, Canada.) and attached to the mask. Esophageal pressure was measured with a balloon sealed over the end of a tube placed in the distal third of the esophagus and distended with 5 cm³ of air. The catheter was placed so that there was a maximal variation in transpulmonary pressure (ΔP_L) and minimal cardiac artifact. The catheter was connected to a differential pressure transducer (Model HCXPM005DV6V,

Sensor Technics, Newport News, Va, USA). Transpulmonary pressure (P_L) was defined as the difference between atmospheric and esophageal pressure.

The pneumotachograph and the pressure transducers were calibrated before each experiment. Signals from the transducers were converted by a computer, which was equipped with data acquisition and analysis programs (Anadat and Labdat 5.1, RHT-infodat, Montreal, Quebec, Canada). The program provided measures of ΔP_L during each respiratory cycle and calculated lung resistance (R_L) and elastance (E_L).

Bronchoalveolar lavage

Horses were sedated with a combination of xylazine (0.6-1.0 mg /kg, IV, Bayer Inc, Toronto, Ontario, Canada) and butorphanol (20-30 μ g/kg, IV, Wyeth Animal Health, Guelph, Ontario, Canada). A fibroscope was introduced into the nostril, directed into the trachea and down into a lung. During the advancement of the fibroscope, the airways were anesthetized using a 0.5% lidocaine (Astra Pharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada) solution. When the tip of the fibroscope was wedged in a bronchus, two 250 ml aliquots of sterile, pre-warmed (37 °C), isotonic saline solution were sequentially infused and aspirated using a suction pump (negative pressure between 50 and 100 mm Hg) into a siliconized glass vessel that was kept on ice. The fluid was filtered through sterile gauze centrifuged at 4°C and washed twice in PBS. The total cell count was determined using a hemacytometer and cell viability was assessed by Trypan blue dye exclusion test. Two aliquots of 10^7 cells were resuspended in Trizol® (Gibco, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada) within 1 hour of collection and stored at -80°C until further analysis.

The differential cell count was performed on a cytospin preparation (Cytospin model II, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) stained with a Wright Giemsa stain. At least 400 cells from each specimen were counted.

Study design

Pulmonary function tests and bronchoalveolar lavages were performed when the horses were at pasture and after 35 days of stabling.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total cellular RNA was extracted from Trizol[®] (Gibco, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's protocol. The concentration and the purity of RNA were determined by spectrophotometry. cDNA strands were generated using 1 µg total RNA, 1 µL of oligo(dT)12-18 primer (Gibco, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada), 2.4 µL of 0.1 M DTT (Gibco, Burlington, Ontario, Canada), 1.5 µL of 25 mM dNTP (100 mM dNTP set PCR Guard, Gibco, Invitrogen corporation, Burlington, Ontario, Canada), 1.2 µL reverse-transcriptase enzyme (Reverse Transcriptase AMV, Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) and 1.2 µL ribonuclease inhibitor (RNAguard[™], Amersham Pharmacia Biotech Inc, Oakville, Ontario, Canada).

Quantitative real-time reverse transcriptase (RT) -PCR analysis

The LightCycler[™] system (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) was used for amplification and data collection (software version 3.5). IL-17 primers were designed according to the GenBank partial sequence AY014959 that we had previously published. CD3-zeta was used as housekeeping gene to correct for the variation of T-cell numbers in BAL (Bowles et al., 2002). The CD3-zeta primers were designed based

on the partial equine mRNA sequence (Dr Horohov, University of Kentucky). All the sets of primers span at least two intron-exon boundaries to allow for discrimination of amplified genomic DNA (IL-17 Reverse: 5'-CTA CCT TCC CTT CGG CAT-3'; IL-17 Forward: 5'-ACC TAA ACG TCC TTA ACC G-3'; CD3-zeta Reverse: 5'-AGA GGA GTA TGA CGG CAT CG-3'; CD3-zeta Forward: 5'-GCA TCG TAG GTG TCC TTG GT-3').

Standard curve samples, made using serial dilutions of known quantities of cDNA, were included in each run. All concentrations of target gene cDNA were calculated relative to their respective standard curves. The results are reported as the IL-17 to CD3-zeta ratio.

All reactions were performed with the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I[®] (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada). This is a ready-to-use, "hot-start" reaction mixture for PCR containing FastStart *Taq* DNA polymerase. The reaction master mix was prepared as recommended by the manufacturer. In brief, 1 μ L of cDNA was added to 19 μ L of reaction mixture which included 25 mM MgCl₂, 0,25 μ M of each CD3-zeta primer or 1 μ M of each IL-17 primer and 2 μ L of LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I[®] (Roche Diagnostics). The samples were amplified and quantified in the LightCycler under the following conditions. Following 10 min of initial denaturation at 95°C, the cycling conditions of 45 cycles consisted of denaturation at 95°C for 0 s, annealing at 57°C for 5 s and elongation at 72°C for 12 s. The LightCycler measured the fluorescence of each sample at every cycle at the end of the elongation step. For distinguishing specific from nonspecific products and primer dimers, a melting curve was obtained after amplification by holding the temperature at 72 °C for 12 s followed by a gradual increase in temperature to 95 °C at a rate of 0.5

°C/s, with the fluorescence signal acquisition mode set to step. To confirm reproducibility, all determinations were performed in duplicates.

Data analysis

Data were analyzed by nonparametric tests (Man-Whitney, Wilcoxon tests and Spearman Rank Correlation). Differences between groups were considered significant when p values were less than 0.05. Due to the small sample size, P values less than 0.1 were considered significant for differences over time within groups.

Results

Horses

When in pasture, horses with heaves were in clinical remission as indicated by the lack of significant differences between groups in the lung function parameters and the BAL cell cytology (Table 1). After 35 days of stabling, all the horses with heaves were in clinical exacerbation of the disease and had symptoms of coughing, dilated nostrils, and characteristic expiratory abdominal effort. Pulmonary mechanics showed significant increases in ΔP_L , R_L and E_L compared to baseline values and values of control horses (Table 1). Conversely, control horses did not developed clinical evidence of respiratory disease during stabling and no significant differences in lung function were noted. A pulmonary neutrophilia developed with stabling in both groups of horses (Table 1).

IL-17 mRNA expression

At baseline, there were no significant differences between groups in the mRNA expression of IL-17 corrected for CD3zeta (Figure 1). After 35 days of stabling, there was an increase in the IL-17/CD3-zeta mRNA expression in all horses with heaves, while in control horses, the expression remained stable or decreased. Using data from all horses combined, the IL-17/CD3 expression after stabling was positively correlated with ΔP_L (Rho = 0.81, $p = 0.03$), R_L (Rho = 0.71, $p = 0.06$) and E_L (Rho = 0.86, $p = 0.02$) but not with the percentage of neutrophils at baseline or during stabling.

Discussion

Previous studies have suggested that T cells may contribute to the inflammatory response in heaves by secretion of Th2-type cytokines (Lavoie et al., 2001; Giguère et al. 2002; Cordeau et al., 2004). However, while airway inflammation in heaves is characterized by neutrophil recruitment into the airways lumen (Fairbairn et al., 1993), the mechanisms resulting in neutrophils chemotaxis and activation in Th2-type response is poorly understood. IL-17, a pro-inflammatory cytokine secreted by activated T-cell, has been shown to indirectly contribute to neutrophil recruitment into the airways of mice, rats and humans (Fossiez et al., 1998; Linden et al., 2000; Linden and Adachi, 2002; Moseley et al., 2003). We therefore postulated that IL-17 could also contribute to neutrophil recruitment into the airways of horses affected by heaves. In the present study, we reported that exposure to moldy hay resulted in an increased expression of IL-17 mRNA in horses with heaves but not in control horses, suggesting that this cytokine may contribute to the heaves' phenotype.

IL-17A (IL-17) is a member of a family of IL-17-like cytokines named IL-17 A-F (Li et al., 2000; Shi et al., 2000; Hymowitz et al., 2001; Lee et al., 2001; Aggarwal and Gurney, 2002; Hurst et al., 2002). IL-17 is expressed almost exclusively by activated T cells and is signaling through a receptor (IL-17R) ubiquitously present in various tissues (Yao et al., 1995b; Yao et al., 1997; Fossiez et al., 1998; Hymowitz et al., 2001; Aggarwal and Gurney, 2002). The role of IL-17 in lung diseases is believed to primarily involve neutrophil activation and recruitment into the airways through the upregulation of different C-X-C chemokines including IL-8, a cytokine that is upregulated in heaves (Laan et al., 1999; Franchini et al., 2000; Hoshino et al., 2000; Linden et al., 2000; Giguère et al., 2002; Linden and Adachi, 2002; Hellings et al., 2003; Prause et al., 2003). IL-17 induces the release of chemokines by bronchial epithelial cells, bronchial fibroblast and macrophages and also upregulate the activity of elastase and myeloperoxidase, which is also enhanced in heaves (Dagleish et al., 1999; Hoshino et al., 2000; Linden et al., 2000; Molet et al., 2001; Moseley et al., 2003; Prause et al., 2003). IL-17 could also contribute to mucus hypersecretion in heaves, as it stimulates the expression of MUC5AC, a mucin gene that is upregulated in these horses (Gerber et al., 2003). Interestingly, out of a panel of 19 cytokines, only IL-17 and IL-6 were able to stimulate airway MUC5AC mucin gene expression by human tracheobronchial epithelium (Chen et al., 2003).

While we anticipated a correlation between IL-17 and airway neutrophilia, the contribution of IL-17 to lung diseases may be more complex than initially proposed. For instance, IL-17 is upregulated in human asthma, a condition in which pulmonary neutrophilia is uncommon (Molet et al., 2001; Barczyk et al., 2003) but does not appear

to be implicated in human chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in which neutrophils are central to the disease. Interestingly, in human COPD, CD8⁺ T cells have been found to be dominant and the CD4⁺ cells appear to be of the Th1 phenotype (Cosio Piqueras and Cosio, 2001). Moreover, and similarly to our findings, the levels of IL-17 in human asthma were correlated to hyperresponsiveness, but not to airway neutrophilia (Barczyk et al., 2003).

A 35-day continuous exposure to environmental dust particles resulted in pulmonary neutrophilia in both groups of horses in the present study but airway obstruction and clinical signs of respiratory diseases were present only in horses with heaves. These findings are consistent with previous reports that when stabled, both young and older horses may develop airway neutrophilia in absence of clinical signs of respiratory diseases (Tremblay et al., 1993; Holcombe et al., 2001). While it is conceivable that some of our control horses were in a pre-clinical stage and would develop heaves later in life, it appears more likely that multiple pathways may lead to pulmonary neutrophilia, some of which represent a transient response to environmental challenges while others are also accompanied with airway dysfunction and remodeling. Horses exposed to a poor stable environment, such as those of the present study, inhale endotoxins at concentrations that causes airway neutrophilia in normal subjects (Pirie et al., 2001). While endotoxin inhalation causes neutrophil recruitment it does not induce lung dysfunction per se, but can induce, in synergy with organic hay dust, detectable airway obstruction in heaves susceptible horses (Pirie et al., 2001; Pirie et al., 2003). Interestingly, IL-17 is also necessary for endotoxin-induced airway neutrophilia (Ferretti et al., 2003). However, in the present study, there was no increased expression

of IL-17 mRNA in control groups, suggesting that endotoxins were probably not solely if at all involved in neutrophil recruitment in control horses.

In conclusion, results of the present study suggest that IL-17 may be implicated in the pathogenesis of heaves. Additional studies are necessary to understand the contribution of IL-17 to airway inflammation and obstruction in equine airway diseases.

Acknowledgements

This study was supported by Merck & Co., Inc, Rahway, NJ, USA.

Table 1 – Mean (\pm SEM) values of maximal changes in transpulmonary pressure (ΔP_L), pulmonary resistance (R_L), pulmonary elastance (E_L), and neutrophil percentages in the BAL of horses with heaves ($n = 4$) and controls horses ($n = 4$) when in pasture and following 35 days of stabling. * Significant ($p < 0.05$) group differences. † Significant differences ($p < 0.1$) from values recorded in pasture.

	<i>Pasture</i>		<i>Stabling</i>	
	Heaves	Controls	Heaves	Controls
ΔP_L (cm H ₂ O)	11.3 ± 1.7	8.6 ± 0.9	$34.6 \pm 7.3^{*\dagger}$	6.8 ± 2.0
R_L (cmH ₂ O/L/s)	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	$2.3 \pm 0.48^{*\dagger}$	0.9 ± 0.2
E_L (cm H ₂ O/L)	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.0	$4.9 \pm 1.8^{*\dagger}$	0.8 ± 0.09
Neutrophils (%)	3.9 ± 2.7	1.18 ± 0.39	$36 \pm 14^{*\dagger}$	$22 \pm 10^\dagger$

Figure caption.

Figure 1. IL-17 corrected by CD3-zeta mRNA expression for the horses with heaves (A) or control horses (B) during pasture and after 35 days of stabling. *Significant ($p < 0.05$) group differences. †Significant differences ($p < 0.1$) from values recorded in pasture.

FIGURE 1 A

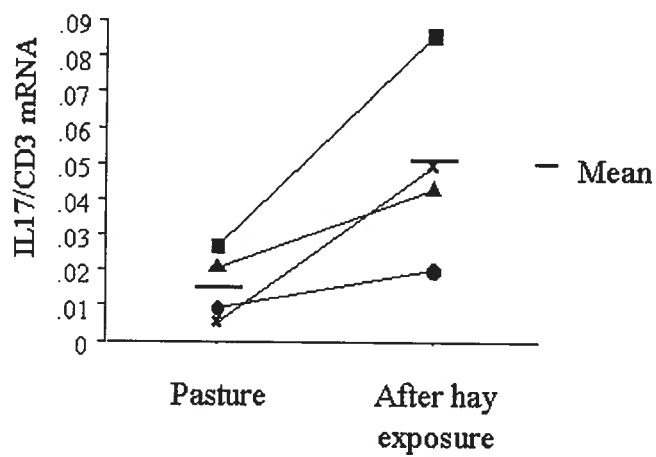
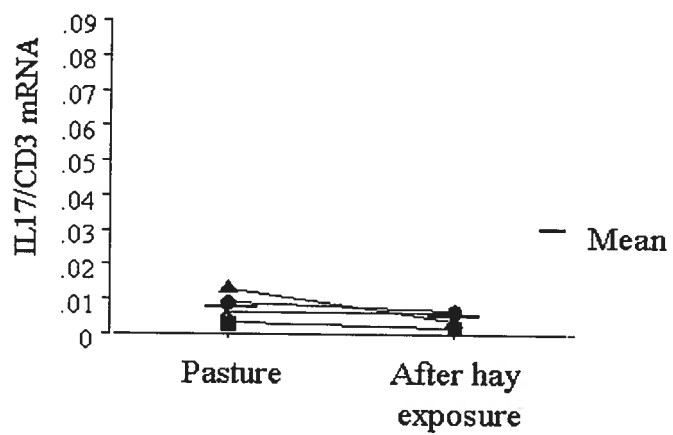


FIGURE 1 B



References

- Aggarwal, S. and A. L. Gurney (2002). "IL-17: prototype member of an emerging cytokine family." J Leukoc Biol **71**(1): 1-8.
- Albanesi, C., C. Scarponi, et al. (2000). "Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes." J Invest Dermatol **115**: 81-87.
- Barczyk, A., W. Pierzchala, et al. (2003). "Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to metacholine." Respir Med **97**(6): 726-733.
- Bowles, K. S., R. E. Beadle, et al. (2002). "A novel model for equine recurrent airway obstruction." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 385-389.
- Chakir, J., J. Shannon, et al. (2003). "Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression." J Allergy Clin Immunol **111**: 1293-1298.
- Chen, Y., P. Thai, et al. (2003). "Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop." J Biol Chem **278**(19): 17036-43.
- Cordeau, M. E., P. Joubert, et al. (2004). "IL-4, IL-5 and INF-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves." Vet Immunol Immunopathol **97**: 87-96.
- Cosio Piqueras, M. G. and M. G. Cosio (2001). "Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J Suppl **34**: 41s-49s.

- Dagleish, M. P., A. D. Pemberton, et al. (1999). "Kinetics of equine neutrophil elastase release and superoxide anion generation following secretagogue activation: a potential mechanism for antiproteinase inactivation." Vet Immunol Immunopathol **72**: 257-275.
- Fairbairn, S. M., C. P. Page, et al. (1993). "Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure." Clin Exp Allergy **23**(10): 821-8.
- Ferretti, S., O. Bonneau, et al. (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." J Immunol **170**(4): 2106-12.
- Fossiez, F., J. Banchereau, et al. (1998). "Interleukin-17." Int Rev Immunol **16**(5-6): 541-51.
- Franchini, M., U. Gill, et al. (2000). "Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay." Am J Vet Res **61**(11): 1369-74.
- Gerber, H., N. E. Robinson, et al. (2003). "Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction." Equine Vet J **35**(3): 252-7.
- Giguère, S., L. Viel, et al. (2002). "cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate." Vet. Immunol. Immunopathol. **85**: 147-158.

- Happel, K. I., M. Zheng, et al. (2003). "Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection." J Immunol **170**(9): 4432-6.
- Hellings, P. W., A. Kasran, et al. (2003). "Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(1): 42-50.
- Holcombe, S. J., C. Jackson, et al. (2001). "Stabling is associated with airways inflammation in young Arabian horses." Equine Vet J **33**(3): 244-249.
- Hoshino, H., M. Laan, et al. (2000). "Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways *in vivo*." J Allergy Clin Immunol **105**(1): 143-149.
- Hurst, S. D., T. Muchamuel, et al. (2002). "New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: *in vivo* function of the novel cytokine IL-25." J Immunol **169**(1): 443-53.
- Hymowitz, S. G., E. H. Filvaroff, et al. (2001). "IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding." Embo J **20**(19): 5332-41.
- Jean, D., A. Vrins, et al. (1999). "Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Vet Res **60**(11): 1341-1346.
- Kleiber, C., G. Grunig, et al. (1999). "Phenotypic analysis of bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in horses with chronic pulmonary disease." Zentralbl Veterinarmed A. **46**(3): 177-84.

- Laan, M., Z. H. Cui, et al. (1999). "Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways." J Immunol **162**(4): 2347-52.
- Lavoie, J. P., K. Maghni, et al. (2001). "Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile." Am J Respir Crit Care Med **164**(8 Pt 1): 1410-3.
- Lee, J., W. H. Ho, et al. (2001). "IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1." J Biol Chem **276**(2): 1660-4.
- Li, H., J. Chen, et al. (2000). "Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family." Proc. Natl. Acad. Sci **97**: 773-778.
- Linden, A. and M. Adachi (2002). "Neutrophilic airway inflammation and IL-17." Allergy **57**(9): 769-75.
- Linden, A., H. Hoshino, et al. (2000). "Airway neutrophils and interleukin-17." Eur Respir J **15**(5): 973-7.
- Martin, J. G. (2000). "International workshop on equine chronic airway disease. Human asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." Equine Vet J **33**: 5-19.
- Molet, S., Q. A. Hamid, et al. (2001). "IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines." J Allergy Clin Immunol **108**(3): 430-438.
- Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, et al. (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." Cytokine Growth Factor Rev **14**(2): 155-74.

- Pirie, R. S., D. D. Collie, et al. (2003). "Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma)." Clin Exp Allergy **33**(5): 676-683.
- Pirie, R. S., P. M. Dixon, et al. (2001). "Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses." Equine Vet J **33**(3): 311-8.
- Prause, O., M. Laan, et al. (2003). "Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells." Eur J Pharmacol **462**: 193-198.
- Robinson, N. E., F. J. Derksen, et al. (1996). "The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses." Br Vet J **152**(3): 283-306.
- Shi, Y., S. J. Ullrich, et al. (2000). "A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and *in vivo* immunomodulatory activity." J Biol Chem **275**(25): 19167-76.
- Starnes, T., M. J. Robertson, et al. (2001). "Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production." J Immunol **167**(8): 4137-40.
- Tremblay, G. M., C. Ferland, et al. (1993). "Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses." Equine Vet J **25**(3): 194-7.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, et al. (2000). "Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus." lupus **9**: 589-593.
- Yao, Z., W. C. Fanslow, et al. (1995). "Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor." Immunity **3**(6): 811-21.

Yao, Z., S. L. Painter, et al. (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." J Immunol **155**(12): 5483-6.

Yao, Z., M. K. Spriggs, et al. (1997). "Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor." Cytokine **9**(11): 794-800.

Chapitre V : Discussion générale des résultats

Au pâturage, aucune différence n'était présente entre les deux groupes de chevaux, que ce soit pour la mécanique respiratoire (ΔP_L , R_L et E_L), le LBA ou le niveau d'expression de l'IL-17. Les chevaux atteints du souffle étaient donc bien en rémission clinique avant le début de l'étude. Après une exposition de 35 jours au foin, tous les chevaux atteints du souffle présentaient les symptômes d'une obstruction respiratoire et une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été mise en évidence. Les chevaux contrôles, quant à eux, étaient cliniquement sains et l'expression de l'ARNm de l'IL-17 était diminuée après exposition au foin. Le pourcentage de neutrophiles était augmenté de façon similaire dans les deux groupes de chevaux.

I RÔLES POTENTIELS DE L'IL-17 DANS LA PATHOGENÈSE DU SOUFFLE.

La plupart des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier les propriétés de l'IL-17 mettent en évidence sa capacité d'induire le chimiotactisme des neutrophiles. En effet, lorsque l'IL-17 est utilisée pour stimuler des cultures cellulaires (entre autres de fibroblastes bronchiques ou de cellules épithéliales bronchiques), celles-ci surexpriment et produisent des cytokines ayant un puissant pouvoir attractif pour les neutrophiles (IL-8, MIP-2, IL-6, GRO- α , GCP-2) ^{19,20}. Des expériences réalisées *in vivo* semblent confirmer le potentiel chimiotactique de l'IL-17. Ainsi, l'instillation intratrachéale d'IL-17 chez des rats est suivie d'une neutrophilie pulmonaire et ce, de façon dose dépendante ²¹. De plus lorsqu'on mesure le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 chez des souris servant de modèle pour l'asthme chez l'homme (préalablement sensibilisées à l'ovalbumine puis soumises à l'inhalation d'ovalbumine) une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-17 est observée et concomitante avec un afflux de neutrophiles dans les voies respiratoires après exposition à l'allergène. Pour confirmer le lien entre l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-17 et la

neutrophilie pulmonaire, un prétraitement avec des anticorps monoclonaux anti-IL-17 a été administré et a abouti à une diminution de cette neutrophilie comparable à celle observée lors d'un traitement stéroïdien (dexaméthazone) ²². Les études menées afin d'investiguer l'expression de l'IL-17 et son implication dans des pathologies respiratoires humaines comme l'asthme et le COPD donnent des résultats surprenants. Par exemple, il a été montré que l'IL-17 est surexprimée chez les patients souffrant d'asthme en comparaison avec des patients contrôles ^{20,26,27}, alors qu'elle ne l'est pas chez les hommes souffrant de COPD ²⁷. Or, une des caractéristiques du COPD est une neutrophilie pulmonaire alors que, dans l'asthme, une éosinophilie domine ¹. Au vu des résultats *in vivo* et *in vitro* obtenus sur l'IL-17, une augmentation de celle-ci aurait été attendue chez les patients souffrant de COPD plutôt que chez les asthmatiques. De plus, le niveau d'IL-17 semble corrélé avec l'hyperactivité bronchique ²⁷. Dans notre étude, aucune corrélation entre le pourcentage de neutrophiles et le niveau d'IL-17 n'a pu être mise en évidence après exposition au foin, et ce, dans aucun des deux groupes. Il faut cependant noter que la mesure a été prise 35 jours après exposition et que, à ce moment, la neutrophilie était bien installée dans le poumon. Il n'est pas impossible que le niveau d'expression de l'IL-17 soit mieux corrélé avec le pourcentage de neutrophiles dans les premiers temps de l'exposition et dès le début de la neutrophilie. Il serait même possible que la neutrophilie suive de façon proportionnelle l'augmentation de l'expression de l'IL-17. Il serait donc intéressant de suivre la cinétique d'expression de cette cytokine en parallèle avec l'installation de la neutrophilie pulmonaire. Lors de notre étude, des échantillons avaient été récoltés 24 heures après avoir exposé les chevaux au foin mais pour des raisons techniques, ces échantillons se sont révélés non analysables.

L'IL-17 pourrait intervenir dans le développement de la neutrophilie pulmonaire par l'intermédiaire de l'IL-8. En effet, l'IL-8, fortement chimiotactique pour les neutrophiles est, comme décrit précédemment, notamment produite *in vitro* par les cellules épithéliales et les fibroblastes bronchiques stimulés par l'IL-17 ^{19,20}. Or, chez les chevaux atteints du souffle, l'IL-8 est surexprimée comparativement aux chevaux contrôles ^{10,24}.

Outre la stimulation de la production de cytokines chimiotactiques, l'IL-17 pourrait donc contribuer à la pathogenèse du souffle chez le cheval notamment en stimulant les

gènes à mucus. En effet, l'hypersécrétion de mucus est une caractéristique du souffle chez le cheval et de l'asthme chez l'homme ^{1,2}. Or, l'IL-17 semble être la seule cytokine, avec l'IL-6, à pouvoir stimuler l'expression de gènes (MUC5B et MUC4AC) responsables de la production du mucus par des cellules épithéliales bronchiques humaines, de singes et de souris ²⁸.

Enfin, l'IL-17 pourrait intervenir dans la pathogenèse du souffle en stimulant indirectement l'apparition de fibrose. En effet, *in vitro*, des cultures de fibroblastes stimulées avec l'IL-17 sont capables de sécréter de l'IL-6 et de l'IL-11, cytokines surexprimées chez les humains souffrant d'asthme, favorisant la fibrose sous-épithéliale et l'accumulation locale de fibroblastes, myofibroblastes et de cellules de muscle lisse ^{20,26}.

II AUGMENTATION DU POURCENTAGE DE NEUTROPHILE CHEZ LES CHEVAUX CONTRÔLES APRÈS STIMULATION

Il fut intéressant de constater que, après 35 jours d'exposition à du foin, le groupe des chevaux contrôles, bien qu'exempts d'obstruction respiratoire comme le démontrent les mécaniques respiratoires, présentait un pourcentage de neutrophiles augmenté de manière statistiquement semblable à celui du groupe des chevaux atteints du souffle. Cette augmentation n'est pas contradictoire avec les données trouvées dans la littérature. En effet une étude montre que la mise en écurie de chevaux, notamment de 3 ans, gardés jusqu'au moment de l'étude en pairie, de telle sorte qu'ils ne pouvaient être sensibilisés aux antigènes présents dans une écurie, exempts de toutes pathologies respiratoires, présentent une inflammation neutrophilique des voies respiratoires profondes ⁹¹.

Il se pourrait que la physiopathologie de la neutrophilie pulmonaire soit différente chez les chevaux sains et chez les chevaux contrôles. L'impact des endotoxines présentes dans le foin sur les chevaux sains ou atteints du souffle en est un exemple. Ainsi, l'inhalation d'endotoxines induit une neutrophilie pulmonaire, que ce soit chez des chevaux contrôles ou chez des chevaux atteints du souffle, et ce, de façon dose-dépendante ⁹². Cependant, à forte dose, seuls les chevaux atteints du souffle développent

un dysfonctionnement pulmonaire sans augmentation du volume des sécrétions bronchiques ni hyperréactivités bronchiques ⁹². Même si les endotoxines sont capables d'activer les mécanismes immunitaires responsables d'une neutrophilie pulmonaire, elles ne peuvent reproduire l'ensemble du syndrome du souffle observé lorsqu'on expose ces chevaux au foin ^{35,92}.

Il est donc possible que le foin auquel nos chevaux ont été soumis contienne une quantité non négligeable d'endotoxines responsables de la neutrophilie chez les chevaux sains. Il n'y aurait probablement pas eu de neutrophilie pulmonaire chez les chevaux contrôles si on les avait soumis uniquement à l'inhalation des poussières organiques présentes dans le foin alors que les chevaux atteints du souffle auraient développé le syndrome clinique classique, comprenant la neutrophilie pulmonaire, quoique probablement atténué par l'absence d'endotoxines ^{35,92}. Cependant, le design de notre étude reste celui le plus proche des conditions observées sur le terrain. D'autre part, comme l'observait Holcombe en 2001, chez les chevaux sains gardés à l'écurie, le pourcentage de neutrophiles reste élevé mais stable et ce, durant les trois mois de son expérience ⁹¹. Même si cette étude ne compare pas ce groupe de chevaux sains avec un groupe de chevaux atteints du souffle, on sait que ces derniers ont tendance à voir augmenter leur pourcentage de neutrophiles avec le temps et, même s'il n'y a pas de corrélation, avec l'importance de la détresse respiratoire ^{3,93}. Il est donc probable que si un LBA avait été effectué quelques semaines plus tard, le pourcentage de neutrophiles des chevaux atteints du souffle aurait été supérieur à celui des chevaux sains.

L'absence d'augmentation et même la diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-17 chez les chevaux contrôles après exposition au foin alors que le pourcentage de neutrophiles a augmenté dans un même temps, nous poussent à émettre quelques hypothèses. Soit l'IL-17 joue un rôle dans le chimiotactisme pour les neutrophiles chez les chevaux atteints du souffle et cela implique que les mécanismes immunitaires aboutissant à la neutrophilie pulmonaire sont différents chez les chevaux contrôles et ceux atteints du souffle, soit l'IL-17 n'est pas un médiateur déterminant dans le développement de la neutrophilie et joue un autre rôle chez les chevaux atteints du souffle, ces deux hypothèses ne s'excluant pas mutuellement.

Des études complémentaires nous éclaireraient quant aux mécanismes d'action de l'IL-17 et son importance dans le développement de la maladie.

III PERSPECTIVES

L'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-17 chez les chevaux atteints du souffle après exposition au foin nous laisse penser que l'IL-17 intervient dans la pathogenèse de la maladie. Des projets de recherche basés sur ce fait pourraient être entrepris afin de déterminer le ou les rôles de l'IL-17, son importance, et si l'IL-17 serait une cible thérapeutique potentielle.

Il serait notamment intéressant d'étudier la cinétique d'expression de l'IL-17 surtout dans les premiers temps d'exposition au foin et la mettre en parallèle avec le développement de la neutrophilie et des symptômes, dans le but d'essayer de mettre en évidence une ou des corrélations.

Une étude clé serait de prétraiter un groupe de chevaux atteints du souffle avec un anticorps monoclonal anti-IL-17, un antagoniste du récepteur, ou encore avec des antisenses empêchant la transcription de l'IL-17, puis de soumettre ce groupe à une exposition au foin, et de le comparer à un groupe de chevaux atteints du souffle sans traitement. Cette étude permettrait de mettre clairement en évidence la ou les actions de l'IL-17. De plus, si cette étude aboutissait à une diminution importante de la neutrophilie pulmonaire, cela permettrait de déterminer le rôle et l'importance des neutrophilies dans le développement du souffle et peut-être donnerait une nouvelle piste pour une thérapie spécifique du souffle. Cependant, ce type d'étude reste dépendant de la disponibilité des molécules utilisées pour prétraiter les chevaux (antigènes ou antisenses), ce qui limite la faisabilité de ces projets.

Enfin l'étude du niveau d'expression du récepteur de l'IL-17 chez des chevaux atteints du souffle versus des chevaux contrôles apporterait une donnée complémentaire intéressante quant à l'impact de la cytokine dans la pathogenèse du souffle.

Chapitre VI : Conclusion

L'IL-17, cytokine pro-inflammatoire produite par les lymphocytes T CD4+, est surexprimée chez les chevaux atteints du souffle après exposition au foin. L'IL-17 joue donc probablement un rôle dans la pathogenèse du souffle en stimulant la sécrétion d'autres cytokines par les cellules bronchiques, fibroblastes ou endothéliales pulmonaires. L'IL-17 pourrait donc, notamment par l'intermédiaire de l'IL-8, être un médiateur important dans le développement de la neutrophilie pulmonaire caractéristique de la maladie ^{10,18-20,24,25}. L'IL-17 pourrait également intervenir dans la pathogenèse du souffle en stimulant la production de cytokines profibrotiques, tels l'IL-6 et l'IL-11 et donc intervenir dans les modifications tissulaires chroniques présentes dans les poumons des chevaux atteints du souffle ^{20,26}. Enfin, de par son potentiel à stimuler directement et indirectement les gènes responsables de la production du mucus, l'IL-17 pourrait être impliquée dans l'hypersécrétion de mucus chez les chevaux atteints du souffle ²⁸. Cette étude jette donc les bases préliminaires nécessaires à la mise en place d'autres projets de recherche afin de déterminer le ou les rôles de l'IL-17 et si l'IL-17 peut s'avérer une cible thérapeutique potentielle.

Chapitre VII : Bibliographie

1. Martin JG. International workshop on equine chronic airway disease. Human asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
2. Robinson NE. International workshop on equine chronic airway disease. Workshop conclusions. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
3. Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, et al. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J* 1996;152:283-306.
4. Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1999;60:1341-1346.
5. Kleiber C, Grunig G, Jungi T, et al. Phenotypic analysis of bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in horses with chronic pulmonary disease. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1999;46:177-84.
6. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after "natural (hay and straw) challenges". *VetImmunol Immunopathol* 1993;36:207-222.
7. Robinson NE, Hamid QA, Ying S, et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-394.
8. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, et al. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1410-3.

9. Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, et al. IL-4, IL-5 and INF-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;97:87-96.
10. Giguère S, Viel L, Lee E, et al. cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;85:147-158.
11. Fairbairn SM, Page CP, Lees P, et al. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy* 1993;23:821-8.
12. Franchini M, Gilli U, Akens MK, et al. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:53-65.
13. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000;Suppl 1:22-27.
14. Linden A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J* 2000;15:973-7.
15. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995;3:811-21.
16. Fossiez F, Banchereau J, Murray R, et al. Interleukin-17. *Int Rev Immunol* 1998;16:541-51.
17. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:155-74.
18. Linden A, Adachi M. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy* 2002;57:769-75.
19. Prause O, Laan M, Lotvall J, et al. Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2003;462:193-198.
20. Molet S, Hamid QA, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:430-438.

21. Hoshino H, Lotvall J, Skoogh BE, et al. Neutrophil Recruitment by interleukin-17 in rat airways *in vivo*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1423-1428.
22. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:42-50.
23. Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, et al. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways *in vivo*. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:143-149.
24. Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, et al. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res* 2000;61:1369-74.
25. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;162:2347-52.
26. Chakir J, Shannon J, Molet S, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1293-1298.
27. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 2003;97:726-733.
28. Chen Y, Thai P, Zhao YH, et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 2003;278:17036-43.
29. Beech J. Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Clin N Am: Equine Pract* 1991;7:79-91.
30. Derksen FJ. Chronic obstruction pulmonary disease In: J. Beech, ed. *Equine Respiratory Disorders*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990;223-235.
31. Seahorn TL, Beadle RE. Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991). *J Am Vet Med Ass* 1993;202:779-782.

32. Breeze RG. Heaves. The problem of disease definition. *Vet Clin North Am: Large Anim Pract* 1979;1:219-230.
33. Chairperson. International workshop on equine chronic airway disease. Chairperson's introduction. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
34. McGorum BC. International workshop on Equine Chronic Airway Disease. Environmental factors as aetiological agents. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
35. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, et al. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy* 2003;33:676-683.
36. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J* 1993;25:261-7.
37. Halliwell RE, McGorum BC, Irving P, et al. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstruction pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;38:201-215.
38. Eder C, Crameri R, Mayer C, et al. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;73:241-253.
39. Cotran SR, Kumar V, Collins T. *Pathologic basis of disease*. sixth ed. Philadelphia: Elsevier Science, 1999.
40. Slauson DO, Cooper BJ. *Mechanism of Disease*. third ed. St Louis: Mosby, 2002.
41. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, et al. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;159:487-494.
42. Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, et al. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:385-389.
43. Marti E, Gerber H, Essich G, et al. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* 1991;23:457-460.

44. Marti E. International workshop on equine chronic airway disease. Genetics of equine chronic airway disease. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
45. Derksen FJ, Robinson NE, Slocombe RF, et al. 3-methylindole-induced pulmonary toxicosis in ponies. *Am J Vet Res* 1982;43:603-607.
46. Slocombe RF. International workshop on equine chronic airway disease. Pathology of the airways. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
47. Matera MG, Amorena M, Lucisano A. Innervation of equine airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2002;15:503-511.
48. Cunningham FM. International workshop on equine chronic airway disease. Inflammatory mediators, including leukotrienes. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
49. Gray PR, Derksen FJ, Robinson NE, et al. The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:154-160.
50. Gray PR, Derksen FJ, Broadatone RV, et al. Decreased airway mucosal prostaglandin E₂ production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:586-91.
51. Gray PR, Derksen FJ, Robinson NE, et al. Increased pulmonary production of immunoreactive 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in an animal model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1092-7.
52. Hotchkiss J. International workshop on equine chronic airway disease. What do we know about mucus. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
53. Kaup FJ, Drommer W, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I: Alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet J* 1990;22:343-348.
54. Gerber H, King M, Schneider DA, et al. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2000;32:411-417.
55. Watson J, Stott JL, Blanchard MT, et al. Phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease and in normal controls. *Vet Path* 1997;34:108-116.

56. Vrins A, Doucet M, Numez-Ochoa L. A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1991;38:472-479.
57. Marr KR, Lees P, Cunningham FM. Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J* 2002;34:65-70.
58. Bureau F, Bonizzi G, Kirschvink N, et al. Correlation between nuclear factor -kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1341-1321.
59. Lekeux P. International workshop on equine chronic airway disease. Transcription factors. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
60. Joubert P, Silversides DW, Lavoie JP. Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon-gamma. *Equine Vet J* 2001;33:730-3.
61. Dagleish MP, Pemberton AD, Brazil TJ, et al. Kinetics of equine neutrophil elastase release and superoxide anion generation following secretagogue activation: a potential mechanism for antiproteinase inactivation. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;72:257-275.
62. Viel L. International workshop on equine chronic airway disease. Endoscopic scores, bronchoalveolar lavage and tracheobronchial cytology. *Equine Vet J* 2000;33:5-19.
63. Winder CN, Fellenberg RV. Chronic small airway disease in horses slaughtered in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk*. 1987;129:585-593.
64. Kaup FJ, Drommer W, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J* 1990;22:349-355.
65. West JB. *Pulmonary pathophysiology*. second edition ed. Baltimore, 1982.
66. Willoughby RA, McDonnell WN. Pulmonary function testing in horses. *Vet Clin North Am: Large Anim Pract* 1979;1:171-196.

67. Bayly W. Lung function: limitations of current methods. International workshop on equine chronic airway disease 2000;5-19.
68. Lavoie JP, Pascoe JR, Kurpershoek CJ. Effect of head and neck position on respiratory mechanics in horses sedated with xylazine. *Am J Vet Res* 1992;53:1652-1657.
69. Lavoie JP, Pascoe JR, Kupershoek CJ. Partitioning of total pulmonary resistance in horses. *Am J Vet Res* 1995;56:924-9.
70. Lavoie JP, Phan ST, Blais D. Effects of a combination of detomidine and butorphanol on respiratory function in horses with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1996;57:705-9.
71. Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, et al. Determinants of the maximal change in pleural pressure during tidal breathing in COPD-affected horses. *Vet J* 1999;157:160-165.
72. Gallivan GJ, Viel L, McDonnell WN. An evaluation of multiple-breath nitrogen washout as a pulmonary function test in horses. *Can J Vet Res* 1990;54:99-105.
73. Votion D, Ghafir Y, Vandenput S, et al. Analysis of scintigraphical lung images before and after treatment of horses suffering from chronic pulmonary disease. *Vet Rec* 1999;144:232-236.
74. Pickles K, Pirie RS, Rhind S, et al. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Vet J* 2002;34:288-291.
75. Pickles K, Pirie RS, Rhind S, et al. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part2: Comparison of smear and cytocentrifuged preparations. *Equine Vet J* 2002;34:292-296.
76. Shi Y, Ullrich SJ, Zhang J, et al. A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and *in vivo* immunomodulatory activity. *J Biol Chem* 2000;275:19167-76.
77. Lee J, Ho WH, Maruoka M, et al. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem* 2001;276:1660-4.

78. Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001;167:4137-40.
79. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: *in vivo* function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002;169:443-53.
80. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo J* 2001;20:5332-41.
81. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, et al. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000;115:81-87.
82. Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *lupus* 2000;9:589-593.
83. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 1995;155:5483-6.
84. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278:1910-4.
85. Cordoba-Rodriguez R, Frucht DM. IL-23 and IL-27: new members of the growing family of IL-12-related cytokines with important implications of therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:715-723.
86. Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, et al. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 2003;179:4665-4672.
87. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998;160:3513-21.

88. Li H, Chen J, Huang A, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2000;97:773-778.
89. Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*. *Immunity* 2001;15:985-95.
90. Nakamura T, Scorilas A, Stephan C, et al. Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-I (MIC-I) gene expression in human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2003;88:1101-1104.
91. Holcombe SJ, Jackson C, Gerber H, et al. Stabling is associated with airways inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J* 2001;33:244-249.
92. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, et al. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 2001;33:311-8.
93. Bracher VD, von Fellenberg R, Winder CN, et al. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random population of swiss horses. *Equine Vet J* 1991;23:136-141.
94. Mazzarella G, Bianco A, Catena E, et al. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy* 2000;33 Suppl 61 :6-9.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant DEBRUE MARIE		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Sciences Cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Marie Debrue, Emma Hamilton, Philippe Joubert, Stéphane Lajoie, Kaddah, Jean-Pierre Lavoie	
Titre Clinical exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin (IL)-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells	
Revue Acta Veterinary immunology immunopathology	Date de publication Submitted

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).		
Coauteur STÉPHANE LAJOIE	[REDACTED]	Date 04/02/25
Coauteur PHILIPPE JOUBERT	[REDACTED]	Date 04/02/25
Coauteur JP LAVOIE	[REDACTED]	Date 08/04/2004
Coauteur Emma Hamilton	[REDACTED]	Date 08-04-04
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001